



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Determinación de la actividad de las sapogeninas presentes en *Pattalus mollis* (pepino de mar) frente a *Candida albicans*

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTORES

Edson Bruno GARAMENDEZ CASTILLO

Mc.Roggers José MARTHANS ROJAS

ASESOR

Dr. Luis Miguel FÉLIX VELIZ

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Garamendez E, Marthans R. Determinación de la actividad de las sapogeninas presentes en *Pattalus mollis* (pepino de mar) frente a *Candida albicans* [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2020.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

Código ORCID del autor	—
DNI o pasaporte del autor	Br. Mc.Roggers José Marthans Rojas 43785811 Br. Edson Bruno Garamendez Castillo 47160895
Código ORCID del asesor	0000-0001-5138-3396
DNI o pasaporte del asesor	Dr. Luis Miguel Visitación Félix Véliz 07371298
Grupo de investigación	—
Agencia financiadora	—
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	Perú, Lima, Cercado de Lima -12.05570 , -77.02361
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2020
Disciplinas OCDE	Farmacología, Farmacia http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.05



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS VIRTUAL

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

Determinación de la actividad de las sapogeninas presentes en *Pattalus mollis* (pepino de mar) frente a *Candida albicans*

Que presentan los Bachilleres en Farmacia y Bioquímica:

EDSON BRUNO GARAMENDEZ CASTILLO Y

MC. ROGERS JOSÉ MARTHANS ROJAS

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

SOBRESALIENTE (17) DIECISIETE

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico(a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 18 de noviembre de 2020

Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera

Presidente



AGRADECIMIENTOS

Es grato expresar nuestro agradecimiento en primer lugar a nuestros padres que son el impulso, ejemplo y fortaleza en nuestra vida, a la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por habernos brindado las enseñanzas necesarias y por habernos acogido en sus laboratorios haciendo este proyecto posible.

Al Dr. Félix Veliz del Departamento de Química orgánica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por la información, asesoramiento y apoyo brindado.

A todas las personas que nos ayudaron en la investigación.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Hipótesis	2
3. Objetivos	2
4. Marco teórico	3
4.1. Antecedentes	3
4.2. <i>Candida albicans</i>	5
4.3. Saponinas	5
4.4. Extracción de saponinas	7
4.5. Pruebas de identificación de saponinas	8
4.6. Pepinos de mar	9
4.7. Holothuroideos en Perú.....	10
4.8. <i>Pattalus mollis</i>	11
4.9. Métodos de ensayo de susceptibilidad antifúngica	12
4.10. Pruebas estadísticas	13
5. Materiales y métodos	16
5.1. Tipo y diseño de estudio	16
5.2. Población y muestra.....	16
5.3. Materiales, equipos y reactivos	17
5.4. Tratamiento inicial de la muestra	19
5.5. Secado de la muestra	19
5.6. Preparación de los macerados.....	20
5.7. Análisis químico de los extractos obtenidos.....	20
5.7.1. Reacciones de identificación de saponinas.....	21
5.7.2. Reacciones para lactonas sesquiterpénicas	21
5.7.3. Cromatografía en capa fina	22
5.8. Purificación del extracto metanólico.....	22
5.9. Cromatografía en capa fina del extracto hidrolizado metanólico	24
5.10. Preparación de las sapogeninas para la cromatografía en capa fina.....	24
5.11. Cromatografía en capa fina a escala preparativa.....	25
5.12. Análisis microbiológico	25
5.13. Análisis estadístico de resultados	28
6. Resultados	29
6.1. Análisis químico del extracto metanólico inicial.....	29

6.2. Cromatografía en capa fina del extracto inicial para identificación para identificación preliminar de saponinas	29
6.3 Cromatografía en capa fina del extracto hidrolizado	30
6.4. Cromatografía en capa fina a escala preparativa.....	32
6.5. Determinación de la actividad antifúngica	35
6.6. Pruebas estadísticas	33
7. Discusión.....	44
8. Conclusiones.....	49
9. Recomendaciones	50
10. Referencias bibliográficas	51
11. Anexos	55

ABREVIATURAS

AD: Anderson-Darling

ATCC: American Type Culture Collection

Da: Dalton

g: gramos

Gen: Generación

IMARPE: Instituto del Mar del Perú

IQ: Instituto Quimioterápico

KS: Kolmogorov-Smirnov

mg: miligramos

μL: microlitros

mL: mililitros

mm: milímetros

nm: nanómetros

pH: Potencial de hidrógeno

R: Reactivo

RJ: Ryan-Joiner

SEM: Scanning Electron Microscopy

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

Sol: Solución

TEM: Transmission electron microscopy.

UV: Ultravioleta

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana

RESUMEN

El microorganismo *Candida albicans* representa un grave problema en la salud pública al provocar graves infecciones oportunistas sobre todo en pacientes inmunodeprimidos. Las sapogeninas representan una solución contra este agente infeccioso. Estos compuestos han sido obtenidos de especies marinas como los pepinos de mar pertenecientes al *Phylum echinodermata*. Por ello se buscó comprobar el efecto de las sapogeninas aisladas del pepino de mar *Pattalus mollis* contra el microorganismo *Candida albicans*. El cuerpo del pepino de mar fue trozado y secado y las saponinas crudas fueron extraídas con metanol. Los ensayos preliminares de coloración y capa fina confirmaron la presencia de saponinas. Se realizó la hidrólisis ácida de las saponinas, para obtener las sapogeninas y estas se aislaron por cromatografía a escala preparativa, luego se utilizó el método de difusión para determinar la actividad inhibitoria contra *Candida albicans*, utilizando como antifúngico de referencia fluconazol. Nuestros resultados evidenciaron una leve acción inhibitoria que se demostró al aplicar una prueba t de student. Se comprobó que las sapogeninas de *Pattalus mollis* poseen una débil acción inhibitoria sobre *Candida albicans*

Palabras clave: *Pattalus mollis*, pepino de mar, *Candida albicans*, saponinas, sapogeninas, acción inhibitoria.

ABSTRACT

The *Candida albicans* microorganism represents a serious public health problem by causing serious opportunistic infections, especially in immunosuppressed patients. Sapogenins represent a solution against this infectious agent. These compounds have been obtained from marine species such as sea cucumbers belonging to the Phylum echinodermata. Therefore, we sought to verify the effect of the sapogenins isolated from the sea cucumber *Pattalus mollis* against the microorganism *Candida albicans*. The body of the sea cucumber was chopped and dried and the raw saponins were extracted with methanol. Preliminary coloration and thin layer tests confirmed the presence of saponins. The acid hydrolysis of the saponins was carried out to obtain the sapogenins and these were isolated by preparative scale chromatography, then the diffusion method was used to determine the inhibitory activity against *Candida albicans*, using fluconazole as a reference antifungal. Our results showed a slight inhibitory action that was demonstrated by applying a student's t test. Sapogenins from *Pattalus mollis* were found to have a weak inhibitory action on *Candida albicans*.

Keywords: *Pattalus mollis*, sea cucumber, *Candida albicans*, saponins, sapogenins, inhibitory action.

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones oportunistas de naturaleza fúngica son una de las más frecuentes y de mayor peligrosidad para los pacientes que se encuentren en situación vulnerable, las especies del género *Candida* son causantes de un gran porcentaje de estos casos y dentro de este género es de importancia resaltar a la especie *Candida albicans*, dado que esta es la de mayor incidencia. Entre los pacientes de mayor situación de riesgo para estas infecciones se encuentran aquellos inmunodeprimidos (mayormente por VIH/SIDA), en tratamiento con inmunosupresores, trasplantados e incluso aquellos con nutrición parenteral.¹ La problemática que se está dando en los últimos años radica en la aparición de más casos de este tipo de infecciones y en la resistencia a los medicamentos que presentan. Es así que desde la década del 70 ha habido un incremento de 3 a 20 veces en este tipo de infecciones, además el 80% de ellas son candidemias.² En cuanto a la resistencia a los medicamentos esto se da por el uso masivo de antifúngicos tanto de forma preventiva como terapéutica y es así como se da un desplazamiento de cepas sensibles a otras más resistentes.³ De este modo es importante realizar la búsqueda de nuevos activos que tengan efectividad y que además tengan un origen natural. Dentro de la amplia gama de compuestos naturales existentes, las sapogeninas aparecen como una alternativa prometedora, estas se encuentran distribuidas ampliamente en la naturaleza principalmente en el reino vegetal, donde parten la mayoría de estudios, sin embargo se conoce también su presencia en especies marinas equinodermas como las estrellas de mar o el pepino de mar, de este último es donde parte la investigación a realizar.

En el presente estudio se realizó la extracción de sapogeninas de la especie marina *Pattalus mollis* (pepino de mar) y posteriormente se evaluó su actividad antifúngica contra *Candida albicans* mediante el ensayo microbiológico de difusión en placa. El estudio es de utilidad para tener nuevas alternativas terapéuticas y de origen natural que posteriormente puedan facilitar el desarrollo de nuevos medicamentos efectivos y seguros en beneficio de la salud pública del país; además de dar a conocer las propiedades de una especie marina poco estudiada como es *Pattalus mollis*, resaltando así la importancia de nuestros recursos marinos naturales.

2. HIPÓTESIS

Las sapogeninas extraídas de la especie marina *Pattalus mollis* (pepino de mar) poseen actividad antifúngica in vitro contra *Candida albicans*.

3. OBJETIVOS

i. Objetivo general

Determinar la actividad antifúngica in vitro de las sapogeninas extraídas de la especie marina *Pattalus mollis* (pepino de mar) contra el microorganismo *Candida albicans*.

ii. Objetivos específicos

- (1) Realizar el análisis químico cualitativo del extracto de pepino de mar.
- (2) Evaluar la actividad antifúngica contra *Candida albicans* de las sapogeninas obtenidas mediante el análisis microbiológico de difusión en placa.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. Antecedentes

Santafé G, Guzmán M y Torres O, 2013, reportaron el aislamiento a partir del pepino de mar *Holothuria floridana* de dos compuestos triterpenos holostánicos, el holosta-22,25-epoxi-7,9-dien-3 β -ol (compuesto 1) y holosta-22,25-epoxi-7,9-dien-17-3 β -diol (compuesto 2), realizaron el ensayo de prueba antifúngica por dilución en agar contra el hongo fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, dando como resultado que el compuesto 1 no presentó zona de halo de inhibición pero el compuesto 2 presentó un porcentaje de zona de inhibición del 93.98% siendo así un resultado prometedor teniendo en cuenta que ya se encontraban reportes de una actividad similar en otras especies de holoturoideos, en estos casos los compuestos estaban en su forma glicosidada mas en el estudio se utilizaron las formas libres.⁴

Sottorff I, et al, 2013, realizaron un extracto purificado a partir del pepino de mar *Athyonidium chilensis*, en la fracción 18 (saponinas) de este extracto se realizaron ensayos para evaluar la actividad antibacteriana, citotóxica y antifúngica, teniendo como resultados en la prueba antifúngica contra *Aspergillus sp*, *Botrytis sp*, *C. albicans* y *Rhizopus sp* zonas de inhibición de 24.5 ± 4 , 13.5 ± 3 y 22 ± 1 mm respectivamente, en el caso de *Rhizopus sp* no hubo actividad en contra de este hongo. Un ensayo posterior de identificación determinó que la fracción 18 contiene 2 saponinas, la primera de ellas tiene un peso molecular de 1522 Da correspondiendo a una nueva saponina propia del *A. chilensis* y la segunda un peso molecular de 764 Da que correspondería a la saponina llamada Holoturinosido D aislada previamente del organismo marino *Holothuria forskali*.⁵

Hing H, et al, 2007, realizaron un extracto crudo metanólico de las especies de pepino de mar *Stichopus chloronotus* y *Holothuria edulis*, obteniendo valores de concentración mínima inhibitoria contra *Candida albicans* de 0.39 mg/mL y 4.0 mg/mL respectivamente, se utilizó el método de dilución en pozos. De igual forma se halló actividad de estos extractos contra las especies de hongos *Aspergillus niger*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum gypseum* y *Rhodotrulla rubra*.⁶

Adibpour N, et al, 2014, realizaron extractos hidroalcohólicos de las paredes del cuerpo, órganos cuvierianos y fluido celómico de la especie de pepino de mar *Holothuria leucospilota*, de estos se evaluó la actividad antibacteriana. También realizaron extractos metanólicos, clorofórmicos y con n-hexano de las paredes del cuerpo. Adicionalmente a ello evaluaron la actividad antifúngica con el método de dilución en caldo. Como resultado obtuvieron una actividad microbiostática, la mayor actividad correspondió a los extractos hidroalcohólicos de la pared del cuerpo, órganos cuvierianos y del fluido celómico contra las especies *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*; *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. brasilensis*. Sin embargo los extractos metanólicos, clorofórmicos y con n-hexano no presentaron actividad contra *Shigella dysenteriae*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus*, *S. epidermidis* y *Candida albicans*. Además los órganos cuvierianos no presentaron ningún potencial antifúngico.⁷

Ismail H, et al, 2008, realizaron extractos crudos y semipurificados (F5, F6) del pepino de mar mediterráneo *Holothuria polii*. Evaluaron la actividad antifúngica contra hongos filamentosos y levaduras. El método que utilizaron fue el de difusión en pozo usando un medio de agar casitona. Tanto el extracto metanólico y acuoso presentaron actividad antifúngica significativa. Las fracciones semipurificadas también exhibieron una actividad antifúngica significativa. Las cepas de *Aspergillus fumigatus* fueron más susceptibles a los extractos y fracciones derivadas, mientras que las de *Trichophyton rubrum* fue menos susceptible. Sin embargo no se observó actividad alguna contra *Candida albicans*. Sugieren que las fracciones polares activas (F5 Y F6) podrían obtener un nuevo compuesto antifúngico.⁸

4.2 *Candida albicans*

El género *Candida* comprende un grupo de levaduras diversas y ubicuas que pueden producir infecciones ya que algunas de ellas son patógenas, dentro de las más virulentas se encuentra la cepa *Candida albicans* que es la que ocasiona caso con mayor mortandad entre pacientes, otras cepas pueden ocasionar estos desenlaces pero el huésped debe estar muy debilitado para ello. *Candida albicans* es el agente más común que produce candidiasis.⁹⁻¹¹

Candida albicans es un agente patógeno oportunista que aprovecha el sistema inmunológico debilitado del huésped para producir infecciones sistémicas graves. La candidiasis que produce puede ser de curso agudo o crónico, además hay tres tipos: la candidiasis mucocutánea, sistémica y la diseminada. La mayoría de estas infecciones son de origen endógeno. Entre los factores que favorecen la aparición de esta infección está el uso previo de antibióticos, aparatos invasores como catéteres, nutrición parenteral, cirugía (trasplantes) y enfermedades como el cáncer.¹²⁻¹⁵

4.3 Saponinas

Derivado del latín “sapo” que significa jabón, toma este nombre este conjunto de compuestos dada su capacidad para formar espuma. Se conoce que pueden poseer propiedades antiinflamatorias, antibacteriales, anticancerígenas, antifúngicas y antivirales.¹⁶

En cuanto a su estructura química mostrado en la figura 1¹⁷, básicamente consisten en un aglicón (esteroide o triterpenico) policíclico ligado a través del carbono 3 con un azúcar. Poseen propiedades anfipáticas debido a que su fracción aglicona es liposoluble y la azucarada hidrosoluble, característica que le da su capacidad de formar espuma.¹⁶

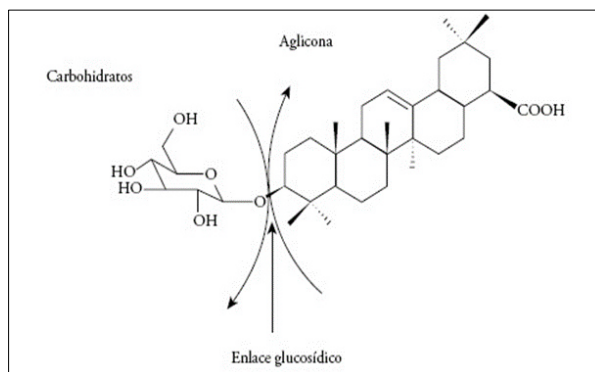


Figura 1. Estructura química básica de una saponina triterpenoide.¹⁷

Existen varios criterios para clasificar a las saponinas pero el más común se basa en la naturaleza del grupo aglicón, pudiendo ser esteroideos o triterpénicos como se ve en la figura 2¹⁸.

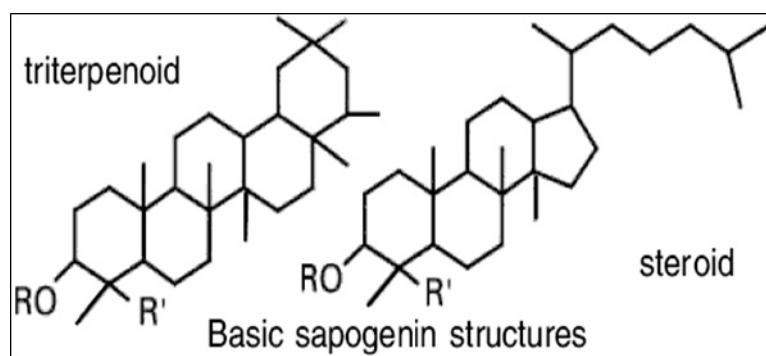


Figura 2. Estructuras básicas de las sapogeninas.¹⁸

La clasificación de estos compuestos se detalla a continuación:

a. Saponinas esteroideas

Este grupo consiste de 27 átomos de carbono formando una estructura hexacíclica denominada espirostan. De este grupo derivan principalmente las hormonas sexuales, cortisona, diuréticos, vitamina D y glucósidos cardiotónicos. Se destaca la diosgenina, hecogenina, ruscogenina y sarsapogenina.¹⁹

b. Saponinas triterpénicas

Estos poseen generalmente una estructura triterpénica pentacíclica o tetracíclica derivando principalmente del dammarano.¹⁹ Este grupo es el que está más ampliamente distribuido en la naturaleza, difiriendo unas de otras solo en el tipo y cantidad de grupo azúcar unido a su estructura. Las uniones van de 1 a 11 azúcares, siendo más común las de 2 a 5 unidades que pueden ser ramificadas o lineales. Dentro de los monosacáridos más comunes tenemos a la glucosa, galactosa, ácido glucorónico y galacturónico, xilosa, fucosa (todos forma D) y arabinosa (forma L).²⁰

4.4. Extracción de saponinas

Existen dos tipos de extracción de saponinas, las convencionales y las verdes. Dentro del primer grupo tenemos la maceración, reflujo y Soxhlet; en el segundo grupo las asistidas por ultrasonido, por ondas microondas y las aceleradas por disolventes. El primer grupo se basa en la solubilidad entre el soluto y disolvente, mientras que el segundo se basa en el uso de insumos más seguros, eficientes energéticamente y no contaminantes.²¹

Se detalla esta clasificación en la tabla 1²¹:

Tabla 1. Técnicas de extracción de saponinas

Técnicas de extracción		
Convencionales	Maceración	Basada en la solubilidad del compuesto activo del material que se remoja en un solvente específico. Su eficiencia depende de la solubilidad y la difusión efectiva. Se usa el etanol como el solvente más común.
	Reflujo y Soxhlet	En ambos procesos está implicado la destilación donde se calienta una solución hasta ebullición y luego los vapores vuelven al recipiente original al condensarse. El etanol es el solvente más utilizado de igual forma que en la maceración.

Tabla 1. Técnicas de extracción de saponinas (continuación)

Técnicas de extracción		
Verdes	Ultrasonido	Técnica donde el ultrasonido crea burbujas de cavitación en el solvente que al colapsar desnaturalizan la pared celular dando así un mayor rendimiento de compuestos bioactivos.
	Ondas microondas	El uso de estas ondas no ionizantes se basa en su penetración en los biomateriales generando calor en las moléculas polares como el agua, este calor producido facilita la difusión de los compuestos bioactivos al alterar la estructura de la célula.
	Acelerada por disolventes	Esta se basa en el uso de temperatura y presión elevada, al realizar esto la temperatura alta favorece la solubilidad de los analitos y la alta presión hace que se mantenga por debajo del punto de ebullición al solvente. Tiene la ventaja de usar poco solvente extractor aunque es poco utilizada.

4.5 Pruebas de identificación de saponinas

En la Tabla 2 se resumen las principales pruebas de identificación de saponinas²²⁻²⁶

Tabla 2. Pruebas para la identificación de saponinas

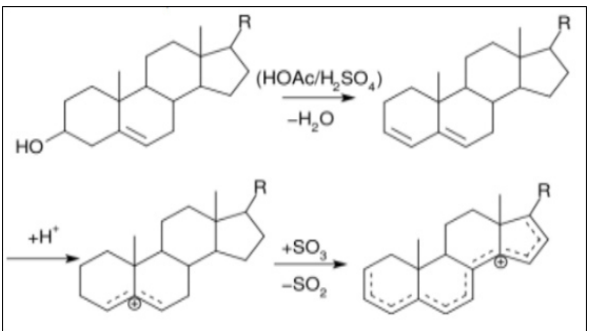
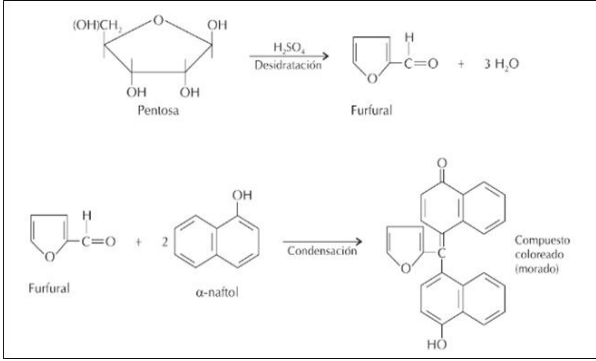
Pruebas de identificación de saponinas		
Reacción de Liebermann-Burchard	Reconoce la presencia de triterpenos y esteroides. Las primeras dan coloraciones rojo, rosado o púrpura mientras que las segundas un color de azul a azul verdoso. La figura 3 muestra el mecanismo de reacción ²³ .	Fundamento de la reacción
		 <p>Figura 3. Reacción de Liebermann-Burchard</p>

Tabla 2. Pruebas para la identificación de saponinas (continuación)

Pruebas de identificación de saponinas		
Reacción de Salkowski	El grupo colesterol forma biesteroides al condensarse. Al formarse un anillo coloreado rojizo se confirma la presencia de colesterol.	
Prueba de alfa naftol (Molisch)	Identifica a los carbohidratos presentes en la molécula de saponina, estos producen una coloración morada. La figura 4 muestra el mecanismo de reacción ²³ .	Fundamento de la reacción
		 <p>Figura 4. Reacción de alfa naftol</p>
Prueba de formación de espuma	En solución acuosa, las moléculas de saponina se alinean verticalmente en la superficie con sus extremos hidrofóbicos orientados lejos del agua. Esto tiene el efecto de reducir la tensión superficial del agua, haciendo que se forme espuma. Por esta razón, las saponinas se clasifican como agentes tensioactivos.	

4.6 Pepinos de mar

Pertenecientes a la clase *Holothuroidea*, estos se encuentran distribuidos ampliamente en los océanos, prevaleciendo en las zonas bentónicas intermareales hasta abisales. Son unas de las más diversas y grandes clases de invertebrados. Si bien mayormente son sedentarios, algunas especies pueden nadar de manera periódica. En cuanto a su alimentación, son amplias las formas en que lo ejecutan siendo principalmente la asimilación de materia orgánica del sedimento, microfitobentones y fauna bentónica. Los pepinos de mar poseen tentáculos en la cavidad oral rodeando la faringe y extendiéndose fuera de la boca. El número de estos tentáculos varía según la especie, pudiendo variar de 10 a 30 tentáculos. También poseen un anillo calcáreo situado en la parte anterior y rodea al esófago, los osículos que poseen diversas formas y es útil en la clasificación de estas

especies. Algunas especies poseen unos órganos denominados tubérculos cuverianos que se expulsan por el ano en situaciones de estrés, actuando así como un sistema de defensa disuasivo. En cuanto a su sistema respiratorio poseen árboles respiratorios que se extienden todo el tronco hasta la apertura cloacal. Su sistema vascular es similar a otros equinodermos, siendo su sistema hemal muy bien desarrollado. Si bien sus sexos son separados existen especies hermafroditas. Existen aproximadamente 1000 especies de pepinos de mar conformando 6 órdenes que conforman la clase: *aspidochirotida*, *apodida*, *molpadiida*, *elasipodida*, *dendrochirotida* y *dactylochirotida*. Esta clasificación se basa principalmente en la forma del tentáculo, anillo calcáreo, árboles respiratorios, pies tubulares y formación ósea. Las especies que más se comercializan son las de las clases *dendrochirotida* y *aspidochirotida* debido a su tamaño grande y que son accesibles a agua menos profundas. Ahora se explotan estas especies mediante la acuicultura debido a su accesibilidad y valor comercial, entre las especies más comunes tenemos *A. japonicus* y *H. scabra*.²⁷

4.7 Holothuroideos en Perú

Hay pocos trabajos en cuanto a la clasificación taxonómica de esta clase en el Perú. Clark en 1910 detalló 7 especies en el mar peruano: *Stichopus fuscus*, *Holothuria chilensis*, *Phyllophorus peruvianus* (*Pattalus mollis*), *Cucumaria leonina*, *Cucumaria godeffroyi*, *Colochirus peruanus* y *Thyone gibber*. Decichman reportó 14 especies que se recolectaron en las expediciones de Allan Hancock entre 1932 y 1938, estas fueron: *Athyonidium chilensis*, *Cucumaria californica*, *Cucumaria dubiosa*, *Euthyonidium ovulum*, *Neothyone gibber*, *Neothyone gibosa*, *Neothyone panamensis*, *Pattalus mollis*, *Pentamera chiloensis*, *Psolidium planum*, *Anaperus peruviana*, *Pentacta peruana*, *Ludwigothuria kefersteini* y *Holothuria theeli*. Bluhm y Gebruk registraron de manera submarina (4140-4160 m) las siguientes especies en tres localidades peruanas: *Holothuroidea indet.*, *Elasipoda*, *Deima validum*, *Oneirophanta mutabilis*, *Psychropotes verrucosa*, *Psychropotes longicauda*, *Benthodytes typica*, *Benthodytes sanguinolenta*, *Benthodytes* tipo 1, *Benthodytes* tipo 2, *Psychropotidae* Gen. 1, *Psychropotidae* Gen. 2, *Psychronaetes hanseni*, *Peniagone diaphana*, *Peniagone elongate*, *Peniagone gracilis*, *Enypniastes eximia*,

Aspidochirotida, *Synallactes* tipo 1, *Synallactes* tipo 2, *Paelopatides* tipo 1 y *Mesothuria* sp. Finalmente Hooker registró trece tipos de *Holoturoideos* en las afueras de Islas Lobos (Lambayaque), de esos trece registros seis fueron nuevos: *Psolidium dorsipes*, *Cucumaria flamma*, *Pseudocnus cali-fornicus*, *Holothuria* sp., *Chiridota* sp. y *Actinopyga* sp.²⁸

4.8 *Pattalus mollis*

Esta especie posee un tamaño mayor o igual a 20 cm, hasta 20 tentáculos de tamaño similar formando círculos concéntricos de cinco pares cada uno. Su piel tiene un grosor considerable además de tener muchos pies ambulacrales. Sus anillos calcáreos tienen cinco radiales rectangulares, sus esquinas son de forma redonda en la parte posterior baja e interradales en la parte basal ancha y baja, además de tener un diente anterior en el grueso de su tejido. En su parte dorsal posee un canal pétreo largo, muchas vesículas de Poli. Sus osículos son similares a bastones ramificados y sus pies tienen placas terminales muy grandes. En cuanto a su coloración, puede variar desde verde oliva, púrpura rojiza hasta un negro opaco, en caso estos sean conservados en alcohol presentan una coloración parda uniforme como se ve en la figura 5 ²⁸.



Figura 5. Especimen de *Pattalus mollis*, puede observarse la tonalidad rojiza que tiene.

A continuación, se resume información adicional sobre esta especie:

- Distribución geográfica: Es común en las costas peruanas y chilenas.
- Distribución batimétrica: Aparece en aguas de poca profundidad.
- Comentarios: Hallado desde la superficie hasta 8 metros.²⁸

4.9 Métodos de ensayos de susceptibilidad antifúngica

El desarrollo y estandarización de ensayos de susceptibilidad antifúngica han constituido un progreso resaltable en el campo de la micología médica. Mientras que los métodos de referencia de ensayos para al menos un género están ahora disponibles, el campo de ensayos de susceptibilidad antifúngica es aún muy dinámico.

Las infecciones fúngicas invasivas son ahora más importantes y problemáticas que antes. En los últimos 20 años ha habido cambios resaltantes en lo que concierne a los factores del huésped, el hongo infectante y los antifúngicos de uso clínico. Estos cambios incluyen:

- 1) El incremento en el número de pacientes con una grave inmunosupresión y el incremento en la incidencia y tasa de mortandad relacionada a infecciones de hongos invasivos que afectan a estos pacientes.
- 2) El desarrollo y emergencia de nuevos antifúngicos
- 3) La emergencia y reconocimiento de resistencia antifúngica.²⁹

Los principales métodos de susceptibilidad antifúngica se dividen en métodos de difusión y de dilución, a continuación detallaremos cada uno:

a. Método de difusión en disco en agar:

En este método las placas de agar son inoculadas con un estándar del microorganismo en estudio. Luego se utilizan discos de papel filtro de 6 mm de diámetro conteniendo el compuesto de ensayo a la concentración deseada. Así, el agente antimicrobiano difunde dentro del agar e inhibe el crecimiento del microorganismo estudiado, finalmente se mide los diámetros de las zonas de inhibición de crecimiento. Este método ofrece muchas ventajas, como por ejemplo

su simplicidad, ser de bajo costo, de fácil interpretación y de poder estudiar una amplia variedad de microorganismos.³⁰

b. Método de difusión de agar en pozo:

Este es ampliamente usado para poder evaluar la actividad antimicrobiana de plantas o extractos. De forma similar al método de difusión en disco, la placa de agar se inocula con un volumen de inóculo microbiano en toda la superficie del agar. Luego se realiza un agujero de 6-8 mm de diámetro con un sacabocado, se añade de 20-100 µL del extracto en el agar, se deja incubar a condiciones adecuadas y finalmente el agente difunde en el medio inhibiendo a las cepas en estudio.³⁰

c. Método de dilución en agar:

Este método envuelve la incorporación de una variedad de concentraciones deseadas del agente antimicrobiano en el medio de agar, usualmente utilizando dos diluciones seriadas, seguidas por la inoculación de un inóculo microbiano definido sobre la superficie de la placa de agar. El punto final de la CMI es registrado como la mínima concentración del agente antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento bajo condiciones adecuadas de incubación. Se ha utilizado este método para combinaciones de drogas-agentes antifúngicos contra *Candida sp*, *Aspergillus*, *Fusarium* y dermatofitos.³⁰

4.10. Pruebas estadísticas

Es necesario evaluar y comparar ciertas características de dos o más grupos. Por ello en estadística es importante determinar que método de análisis es el adecuado y ello dependerá de la naturaleza de los datos y la forma en que fueron obtenidos; de esta forma se dan dos tipos de diseño: observaciones referidas a grupos independientes u otros donde se analizan los mismos sujetos bajo condiciones diferentes.

Se detallará uno de los métodos estadísticos más utilizados para comparación de datos, la prueba t student tanto para muestras independientes como para muestras dependientes.³¹⁻³⁴

a. t student para dos muestras independientes

Este método ampliamente utilizado compara dos grupos independientes de observaciones con respecto a la variable numérica.

Para aplicar este método se necesita que las observaciones cumplan con una distribución normal, esta se puede determinar mediante los test estadísticos de Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilks y Ryan-Joiner. Se exige también que las varianzas en ambos grupos sean equivalentes, en caso no sea así se usará la prueba para varianzas desiguales.

Así el test se basa en la siguiente fórmula:

$$t = \frac{X - Y}{\sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m}} \sqrt{\frac{(n-1)s_1^2 + (m-1)s_2^2}{n+m-2}}}$$

Donde:

X e Y son el promedio de cada grupo.

S₁² y S₂² son las cuasi varianzas muestrales.

n y m son el número de muestras de cada grupo.

En caso la hipótesis nula sea cierta el estadístico seguirá una distribución t con n+m-2 grados de libertad. Si fuera así el valor obtenido debe de estar en el rango de más probabilidad según la distribución mostrada en la figura 6 ³⁵.

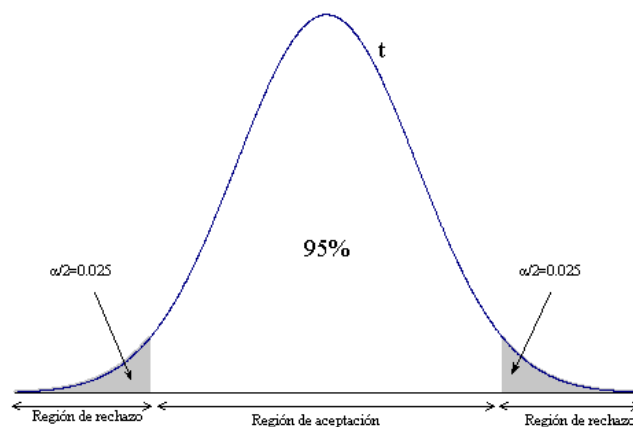


Figura 6. Distribución normal de probabilidad.

Por lo general se utiliza el rango de datos donde está el 95% de probabilidad. Es también utilizado el valor p, donde si este es muy pequeño (< 0.05) es muy poco probable que se cumpla lo dicho por la hipótesis nula y deberá rechazarse. La zona de aceptación está comprendida para los valores $p > 0.05$.^{35,36}

b. t de student para dos muestras independientes con varianza desigual

En caso se tenga dos grupos independientes con varianzas desiguales, se debe realizar una modificación que tenga en cuenta esa variabilidad. Para determinar la igualdad o desigualdad de varianzas se utiliza el test F o razón de varianzas resumido en la siguiente ecuación:

$$F = \frac{S1^2}{S2^2}$$

El valor de la razón de varianzas se debe comparar con una distribución F. En caso el valor p sea $p < 0.01$, va a ser muy poco probable que los datos provengan de poblaciones con igual varianza.

Una vez determinada la desigualdad de varianzas se hace una modificación al test de t de student conocido como test de Welch basado en la siguiente fórmula:

$$t = \frac{(X - Y)}{\sqrt{\frac{S1^2}{n} + \frac{S2^2}{m}}}$$

Esto lleva a un resultado estadístico t que se relaciona con una distribución t de Student con un determinado número de grados de libertad. Usando el valor p valor resultante y si es menor a 0.001 se rechazaría la hipótesis nula, caso contrario si fuera mayor el p valor.³⁷

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Tipo y diseño de estudio

El tipo de estudio es experimental cuantitativo. La parte química se realizó en las instalaciones del laboratorio de química orgánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UNMSM) mientras que la parte microbiológica en las instalaciones del instituto quimioterápico (IQ Farma).

5.2. Población y muestra

a. Población de estudio

La población de estudio estuvo conformada por 50 pepinos de mar de la especie *Pattalus mollis* recolectadas en mayo del 2017 en las playas circundantes a La Herradura, Chorrillos, Lima, Perú.

b. Colecta de la especie

Los especímenes de pepino de mar (*Pattalus mollis*) fueron recolectados el 2 de julio del 2017 en las playas de Chorrillos, específicamente la playa Redondo II. Estos fueron conservados en agua de mar y transportados en baldes, posteriormente se realizó el muestreo biométrico correspondiente que se detalla en el Anexo A. En el muestreo biométrico se evaluaron las medidas, sexo y peso de cada espécimen recolectado.

c. Identificación de la especie

Los pepinos de mar recolectados fueron llevados al Instituto Peruano del Mar (IMARPE) para su posterior identificación y clasificación taxonómica (anexo B).

5.3. Materiales, equipos y reactivos

a. Material de laboratorio

- Frascos de vidrio ámbar de 1 L.
- Frascos de vidrio de 1 L
- Placas Petri de plástico
- Asa de siembra de metal
- Asa de Drigalsky
- Micropipeta de 100 μ L
- Sacabocado de 6 mm
- Embudo de plástico
- Envases de plástico de 500 mL
- Bandejas de vidrio anchas
- Papel de filtro whattman n° 42
- Frascos de vidrio de 100 mL
- Vasos de precipitado de 100 mL y 250 mL
- Tubos de ensayo
- Gradilla de metal
- Probeta de vidrio de 20 mL y 100 mL
- Pipetas graduadas de 5 mL y 10 mL
- Matraces volumétricos de 10 mL
- Cromatofolios Merck Silica gel 60 F254
- Cuba cromatográfica
- Mechero Bunsen
- Tubos Capilares de vidrio sin heparina
- Peras de bromo de 250 mL
- Picetas de plástico
- Folios de alupol
- Balón de vidrio de fondo redondo

b. Equipos

- Estufa de secado Memmert UN55
- Equipo de reflujo
- Equipo de baño María
- Lámpara UV de 254 nm y 365 nm
- Balanza analítica Radwag
- Balanza analítica Mettler-Toledo XS205 Dual range
- Incubadora microbiológica
- Cocinilla eléctrica

c. Reactivos

- Reactivos de coloración:
 - R. Liebermann-Burchard,
 - R. Alfa-naftol
 - R. Baljet
 - R. Salkowski
 - R. Legal.
- Revelador: R. Liebermann-Burchard
- Reactivo: HCl 2N, Reactivo turbidimétrico Mc-Farland
- Medio de cultivo: Agar dextrosa Sabouraud
- Solventes: Etanol absoluto (medio en hidrolisis)
 - Metanol R
 - n-Butanol
 - Agua Purificada
 - Ácido Acético Glacial
 - Etanol 96°
 - Éter de Petróleo
 - Acetato de Etilo
 - Dimetilsulfóxido

5.4. Tratamiento inicial de la muestra

Una vez que se realizó el muestreo biométrico y la identificación de la especie (Anexos A y B) se procedió a lavar los especímenes con agua potable, se distribuyeron en bandejas (figura 7), evisceraron y trozaron para luego proceder con el secado a temperatura ambiente durante 1 semana.



Figura 7. Muestras de pepino de mar (*Pattalus mollis*) recolectadas y clasificadas en bandejas.

5.5. Secado de la muestra

Las muestras trozadas (3575 g) fueron llevadas a las instalaciones del laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM donde se sometieron al proceso de secado. Se utilizó una estufa de secado Memmert UN55 (Figura 8) a una temperatura de 40°C por 6 días.



Figura 8. Estufa de secado conteniendo las muestras trozadas

5.6. Preparación de los macerados

Las muestras secas del pepino de mar fueron sometidas a reducción de tamaño de partícula para facilitar la operación de extracción. Se utilizaron 200 g de muestra seca molida y se le añadió 1000 mL de metanol, la muestra fue depositada en un frasco ámbar y se almacenó en un ambiente protegido de la luz durante 7 días realizándose una agitación diaria.

Una vez pasados los 7 días se procedió a filtrar el extracto, recibiendo el filtrado en un frasco plástico. Luego este fue almacenado en bandejas y se procedió a concentrarlo en la estufa a una temperatura de 40°C (Figura 9).



Figura 9. Extracto metanólico almacenado en bandejas para su concentración en estufa.

5.7. Análisis químico de los extractos obtenidos

El extracto seco metanólico se pesó y se almacenó en un frasco de vidrio, el peso se determinó restando el peso de la muestra más el frasco con el del frasco vacío (Anexo C). El peso obtenido fue de 27,97 g. Este extracto fue sometido a pruebas de coloración para identificación de saponinas y lactonas sesquiterpénicas, además de ensayarse una cromatografía en capa fina preliminar.

5.7.1 Reacciones de identificación de saponinas

a) Prueba de Liebermann-Burchard:

Procedimiento:

A 1 mg de extracto añadir 2 mL de anhídrido acético, 2 mL de cloroformo y enfriar a 0 °C. Añadir 2 gotas de ácido sulfúrico (concentrado). La aparición de un color azul que pasa a anaranjado y luego a verde, indica una reacción positiva.

b) Prueba de Salkowski:

Procedimiento:

A 1 mg de extracto añadir 2 mL de cloroformo y 2 mL de ácido sulfúrico (concentrado). La aparición de una coloración naranja indica reacción positiva.

c) Prueba del alfa naftol (Molish):

Procedimiento:

A 1 mg de extracto añadir 2 mL de etanol y 2 gotas de solución 0,1% de alfa naftol, añadir por la pared del tubo de ensayo 2 mL de ácido sulfúrico (concentrado). Un anillo de color violeta en la interfase indica reacción positiva.

5.7.2 Reacciones para lactonas sesquiterpénicas

a) Reacción de Baljet

Reactivos:

Sol. A: 1 g de ácido pícrico en 100 mL de etanol

Sol. B: 10 g de NaOH en 100 mL de agua

Mezclar ambas soluciones en volúmenes iguales

Procedimiento:

1 mg de extracto seco se disuelve en etanol, 2 o 3 mL de esta solución se le adiciona 3 o 4 gotas de reactivo, una coloración anaranjada o roja oscura indica una reacción positiva.

b) Legal**Procedimiento:**

Disolver 1 mg de extracto seco en 2 a 3 gotas de piridina, luego añadir una gota de sol. 5% de nitroprusiato de sodio y de 1 a 3 gotas de NaOH 2N. El color rojo intenso indica una reacción positiva.

5.7.3 Cromatografía en capa fina

Fase estacionaria: Cromatofolio de aluminio con sílica gel 60 F₂₅₄.

Fase móvil: n-butanol: agua: ácido acético (84:14:7)

Volumen de inyección: 10 µL (muestra disuelta en etanol)

Revelador:

Reactivo Liebermann-burchard, calentamiento a 100 °C.

5.8. Purificación del extracto metanólico**a. Obtención del extracto crudo de saponinas**

Se tomó aproximadamente 5 gramos del extracto metanólico seco (figura 10) y se disolvió en agua purificada (50 mL), la solución obtenida se colocó en una pera de bromo de 125 mL. Se añadió 50 mL de eter de petróleo con la finalidad de desengrasar la muestra, se agitó y eliminó la fase orgánica. La solución acuosa obtenida se vuelve a colocar en una pera de bromo (125 mL) y se añade 50 mL de n-butanol saturado con agua (figura 11), posteriormente se realiza una segunda extracción. Las dos fases de n-butanol se juntan y se evaporan.



Figuras 10 y 11. Peso utilizado de extracto metanólico de pepino de mar (10) y extracción con n-butanol en pera de bromo (11)

b. Hidrolisis del extracto crudo de saponinas

Se tomó el extracto crudo obtenido previamente y se añadió 75 mL de etanol absoluto y 75 mL de HCl 2N, se colocó en un balón de fondo redondo acoplado a un equipo de calentamiento a reflujo para realizar la hidrolisis (Figura 12).

Se sometió a reflujo la solución durante 3 horas y luego se concentró hasta la tercera parte del volumen inicial. Posteriormente se añadió agua purificada en cantidad equivalente a la solución obtenida en el reflujo, esta última solución se extrajo dos veces con 50 mL de acetato de etilo en una pera de bromo. Se separó la fase orgánica y se concentró a una temperatura de 60°C a sequedad.



Figura 12. Proceso de reflujo del extracto metanólico purificado

5.9. Preparacion de las sapogeninas para la cromatografía en capa fina

Se procedió a pesar 10 mg de extracto purificado para llevarlo a una concentración de 1mg/mL en una fiola de 10 mL, esto para la cromatografía en capa fina.

5.10. Cromatografía en capa fina de los extractos hidrolizados

Se usó la fase móvil: n-butanol: agua: ácido acético glacial (84:14:7)

Se utilizó un cromatofolio de aluminio con sílica gel 60 F254 de 10 cm x 20 cm y se inyectó un volumen aproximado de 10 μ L, se saturó la cuba con la fase móvil durante 30 minutos y se colocó la placa para su desarrollo (Figura 13). Una vez llegado al frente de solvente (15 cm) se retiró la placa, se reveló con reactivo de Liebermann-Burchard y posteriormente con una lámpara UV tanto a 254 nm y 365 nm.

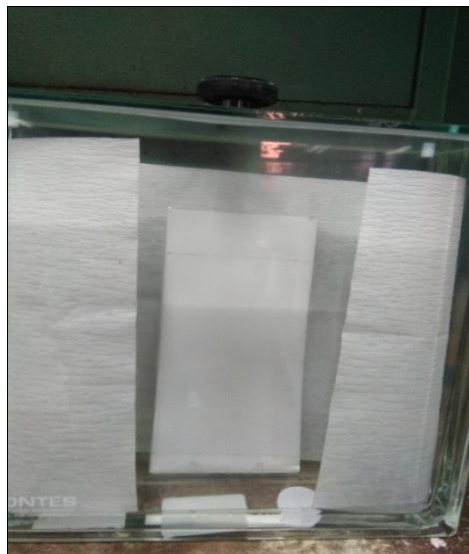


Figura 13. Cromatografía en capa fina de extractos hidrolizados

5.11. Cromatografía en capa fina a escala preparativa

Se utilizó una placa de aluminio con sílica gel 60 F254 de 20 cm x 20 cm y se inyectó un volumen de 100 µl de muestra previamente diluida. Se colocó la placa para su desarrollo en la cuba con la fase móvil (n-butanol: agua: ácido acético glacial (84:14:7)). Se procedió a revelar la placa cromatográfica y se separaron dos fracciones (Fracción A y Fracción B), identificándose mediante la reacción de Lieberman Bouchard.

5.12 Determinación de la actividad antifúngica por medio del método de difusión en placa

a. Preparación del medio de cultivo

La preparación del medio de cultivo se realizó según las indicaciones dadas por el fabricante.³¹ En este caso se usó agar Sabouraud dextrosa al 4% marca Merck.

Para la preparación de este medio se suspendió 26g de agar en 400 mL de agua purificada, se evaluó el pH a 25°C donde el rango fue entre los 5,4 y 5,8 , se autoclavó por 15 minutos a 121 °C, la apariencia luego del autoclavado fue clara y de color marrón amarillento, se tuvo el cuidado de no sobrecalentar el medio.³⁸

Posterior al autoclavado se llevó a baño maría a 50°C y se dejó en reposo hasta su uso (llevar a temperatura aproximada de 45°C)³⁸

b. Preparación del inóculo

La cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 se obtuvo del CLEIBA en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Para la reactivación de la cepa se tomó una asada de la superficie de la cepa y se transfirió a un tubo de caldo sabouraud de 10 mL de volumen, se dejó en incubación por 32-48 horas entre 26°C \pm 1°C, posteriormente se sembró 100 μ L de la solución en una placa de Petri con agar Sabouraud y con la ayuda de un asa de Drigalsky se diseminó por toda la placa se dejó secar por un minutos y se llevó incubar por 48 horas a 26 °C \pm 1°C. Finalmente, en un tubo de ensayo conteniendo 10 mL de solución salina se realizaron asadas constantes del cultivo hasta alcanzar la escala 0,5 de Mc. Farland.³⁸

c. Preparación de placas

Con la ayuda de una micropipeta se incorporó 50 μ L de la cepa de *Candida albicans* (0,5 McFarland) por cada 100 mL de agar sabouraud dextrosa, se agitó suavemente

el frasco de agar sabouraud (400 mL) por cada añadido de la cepa, logrando así el homogenizado de la solución. Con la ayuda de una probeta de 20 mL de volumen se vertieron 20 mL de la solución del frasco de agar sabouraud conteniendo la cepa de *Candida albicans* por cada placa de petri y se dejó en reposo hasta su solidificación.³⁸

d. Formación de los pocillos.

Se empleó la técnica de pocillos³⁹ en agar por lo que una vez que se solidificaron las placas, con la ayuda de un sacabocado de dimensión 6mm se realizaron 3 pocillos por placa separados equidistantemente a 20 mm de distancia formando un triángulo equilátero.

e. Preparación de concentraciones del extracto de sapogeninas y del estandar de fluconazol

Se procedió a preparar soluciones estándar de fluconazol a las concentraciones de 0.1, 0.01 y 0.001 mg/mL de la siguiente manera:

Se pesó 1 mg de Fluconazol y se colocó en una fiola de 10 mL, se procedió a disolver el estándar con 5 mL de dimetilsulfoxido, se sometió a sonicación por ultrasonido hasta observar completa disolución del estándar, luego se retira la fiola del sonicador y se lleva a volumen con dimetilsulfoxido. La concentración obtenida es de 0.1 mg/mL, luego se toma una alícuota de 1 mL y se coloca en una fiola de 10 mL, se lleva a volumen con dimetilsulfoxido obteniéndose así la concentración de 0.01 mg/mL, finalmente de esta última dilución se toma una alícuota de 1 mL y se coloca en otra fiola de 10 mL, se lleva nuevamente a volumen con dimetilsulfoxido y obtenemos finalmente la concentración de 0.001 mg/mL. Con respecto a la preparación de las muestras conteniendo sapogeninas se obtuvieron las mismas concentraciones.³⁹

f. Enfrentamiento de *Candida albicans* frente a las saponinas

Se utilizaron tres placas con pocillos para cada una de las concentraciones de sapogeninas y fluconazol (anexos D y E) y una para el blanco. El volumen de inóculo utilizado fue de 50 µL y se llevó a incubar a 30°C por 48 horas hasta su lectura.³⁹

5.13. Análisis Estadístico de Resultados

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa minitab y excel, el primero para las pruebas de normalidad y el segundo para las pruebas t de student de comparación de medias. Los cuadros y cálculos estadísticos se detallan en la parte de resultados.

6. RESULTADOS

6.1. Análisis químico del extracto metanólico inicial

Tabla 3. Análisis químico preliminar de extractos metanólicos de pepino de mar

Compuesto a identificar	Reacción	Resultado
Esteroides	Liebermann-Burchard	+
	Salkowski	+
	Molisch	+
	Baljet	-
Lactonas sesquiterpénicas	Legal	-

Leyenda:

(+) Reacción positiva

(-) Reacción negativa

Las imágenes con las reacciones se pueden observar en los anexos F y G.

6.2. Cromatografía en capa fina del extracto inicial para identificación preliminar de saponinas

Se observa una coloración rojiza al revelado con el reactivo de Liebermann-Burchard (figura 14).

Cromatografía preliminar de identificación de saponinas

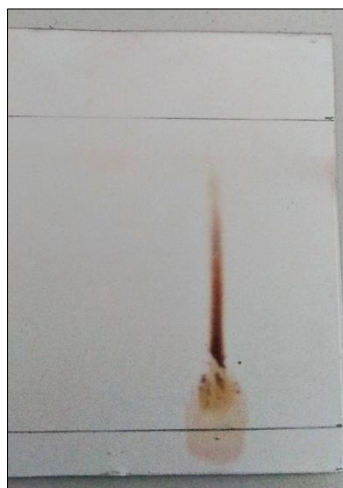


Figura 14. Placa cromatográfica revelada con el reactivo de Liebermann-Burchard

6.3. Cromatografía en capa fina del extracto hidrolizado

Al utilizar el revelado con el reactivo de Liebermann-Burchard se observó una coloración rojiza a lo largo del recorrido de la muestra que posiblemente corresponda a sapogeninas (figura 15).

Cromatografía en capa fina del extracto hidrolizado



Banda observada con el revelador de Liebermann-Burchard, posiblemente corresponda a saponinas

Figura 15. Placa cromatográfica revelada con el reactivo de Liebermann-Burchard en el extracto hidrolizado
F.E: Silica gel 60 F254
F.M: n-butanol: agua: ácido acético (84:14:7)
M1: extracto metanólico

Al revelarse con luz UV a 254 nm y 365 nm se observan bandas fluorescentes en ambas placas cromatográficas, posiblemente correspondientes a las saponinas (Figuras 16 y 17)



Figura 16. Revelado de placa a 254 nm

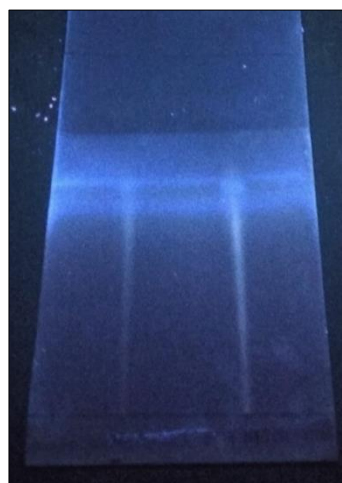


Figura 17. Revelado de placa a 365 nm

6.4. Cromatografía en capa fina a escala preparativa

Se observó fluorescencia en la banda superior y la denominamos como Fracción A (Figura 18), esta fracción correspondiente a sapogeninas fue raspada y sometida al procedimiento descrito previamente en la parte experimental, obteniéndose unos cristales que se observan en el fondo del beaker (Figura 19).

Cromatografía a escala preparativa de las sapogeninas

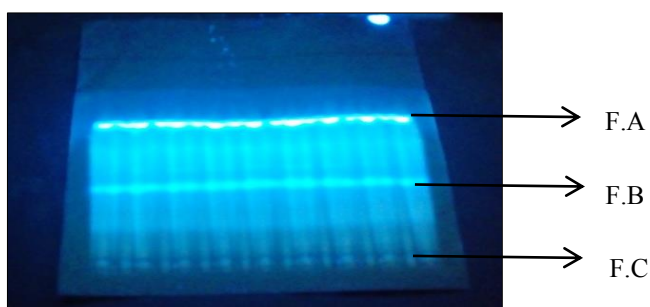


Figura 18. Cromatografía en capa fina a escala preparativa, se realizó el raspado de la zona superior fluorescente.

F.A: Fracción A
F.B: Fracción B
F.C: Fracción C



Figura 19. Cristales obtenidos tras el secado del filtrado con papel Whattman

6.5. Determinación de la actividad antifúngica

En el análisis microbiológico usando el método de dilución en pocillos se obtuvo los siguientes diámetros de halos de inhibición:

Tabla 4. Accion antifungica sobre *Candida albicans* ATCC 10231 de extractos metanolicos de sapogeninas de pepinos de mar

Réplica	Diámetro de zonas de inhibicion (mm)			
	ST FLUCONAZOL	EXTRACTOS METANOLICOS SAPOGENINAS		
	0.1 mg/mL	0.1 mg/mL	0.01 mg/mL	0.001 mg/mL
1	29,37	6,30	0	0
	28,47	6,73	0	0
	28,71	8,35	0	0
2	28,56	8,51	0	0
	28,84	7,36	0	0
	28,91	7,41	0	0
3	29,17	6,55	0	0
	28,49	7,51	0	0
	28,76	8,16	0	0

Los halos de inhibición obtenidos con el fluconazol a 0.1 mg/mL y con las sapogeninas a 0.1 mg/mL se observan en las figuras 20 y 21.

Figura 20: Placas con los halos de inhibición de estándar de fluconazol por triplicado

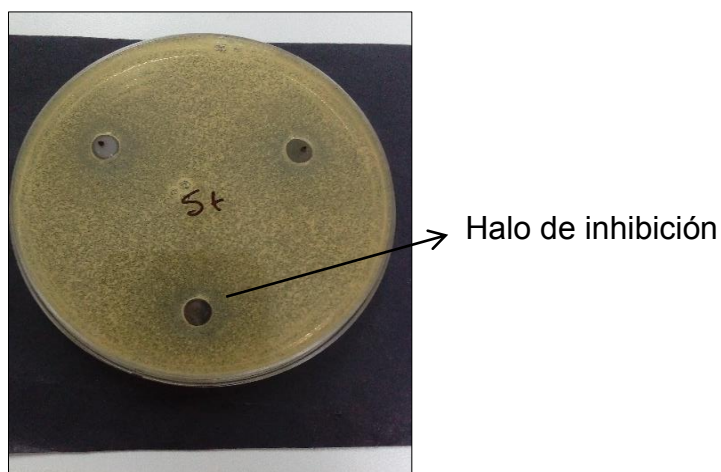


Figura 20. Halos de inhibición del estándar de fluconazol a concentración 0.1 mg/mL (Se analizó por triplicado).

Figura 21: Placas con los halos de inhibición a la concentración de sapogenina de 0.1 mg/mL por triplicado.

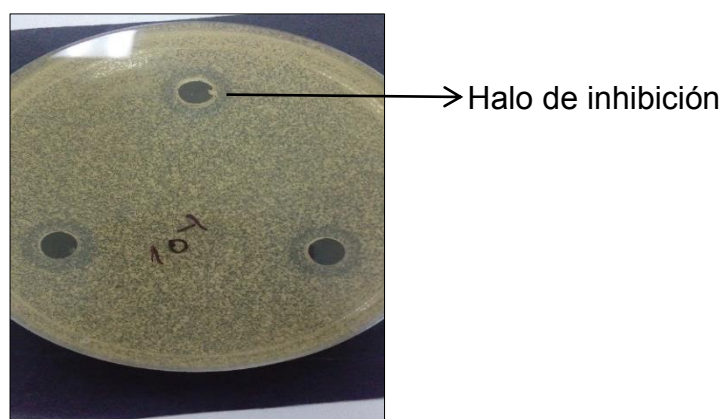


Figura 21. Halos de inhibición de las sapogeninas a concentración 0.1 mg/mL.

6.6. Pruebas estadísticas

Prueba t de student para muestras independientes

Tabla de resultados de estándares y muestras:

Tabla 5. Resumen de resultados de diámetros de halo de inhibición tanto de fluconazol como de sapogeninas purificadas

Muestras	Diámetros fluconazol concentración 0.1 mg/mL (mm)	Diámetros sapogeninas concentración 0.1 mg/mL(mm)
1	29.37	6.30
2	28.47	6.73
3	28.71	8.35
4	28.56	8.51
5	28.84	7.36
6	28.91	7.41
7	29.17	6.55
8	28.49	7.51
9	28.76	8.16
Promedio	28.81	7.43
Desv.Est.	0.31	0.80
Varianza	0.09	0.64

Definimos los parámetros para la comparación de promedios:

- Se acepta los supuestos de normalidad de ambos grupos: En nuestro caso los demostramos con el uso de tres estadísticos (Anderson-Darling, Ryan-Joiner y Kolmogorov-Smirnov) usando el programa Minitab.
- Fijamos el nivel de significancia estadística (α): en este caso usaremos el valor de alfa (0.05)

c) Hipotesis Estadística:

Ho:

$$\mu_{\text{Fluconazol}} = \mu_{\text{Sapogenina}}$$

H1:

$$\mu_{\text{Fluconazol}} \neq \mu_{\text{Sapogenina}}$$

Se detalla cada premisa a continuación:

a) Determinamos la normalidad de los grupos (fluconazol y sapogeninas):

i) Prueba de hipótesis

Nivel de Confianza 95% (0.95)

Nivel de significancia 5 % (0.05)

1. Ho: Los datos se distribuyen normalmente

2. H1: Los datos no se distribuyen normalmente

a. P-Valor > Nivel de significancia (0.05) --> No rechaza Ho

b. P-Valor < Nivel de significancia (0.05) --> Rechaza Ho

Fluconazol:

Prueba Anderson-Darling

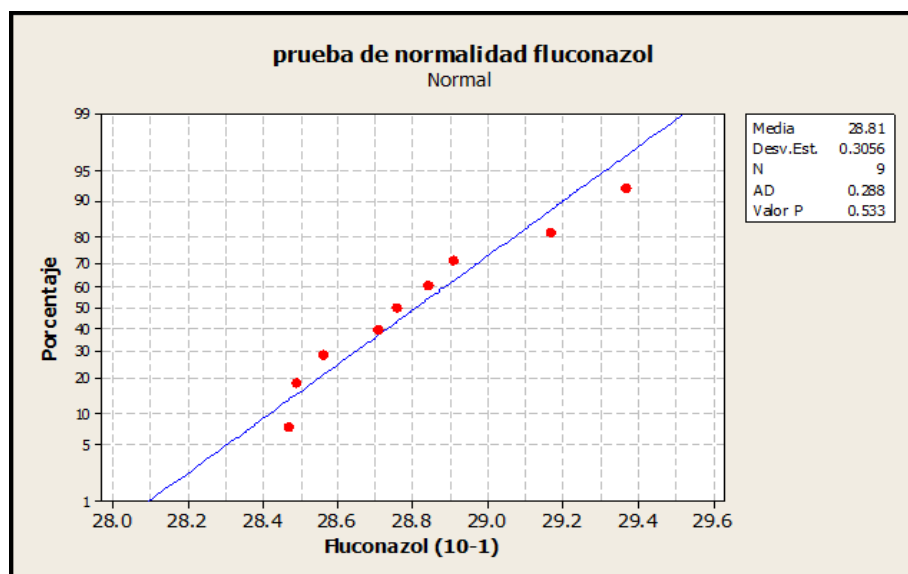


Figura 22. Resultado de prueba de Anderson-Darling obtenidos con minitab.

Ryan-Joiner

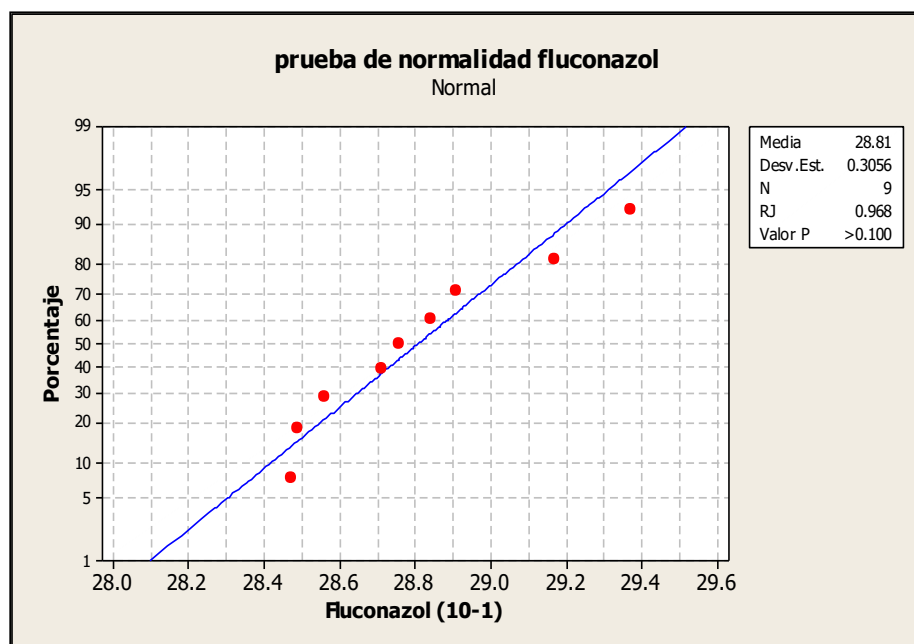


Figura 23. Resultado de prueba de Ryan-Joiner obtenido con minitab.

Prueba Kolmogorov-Smirnov

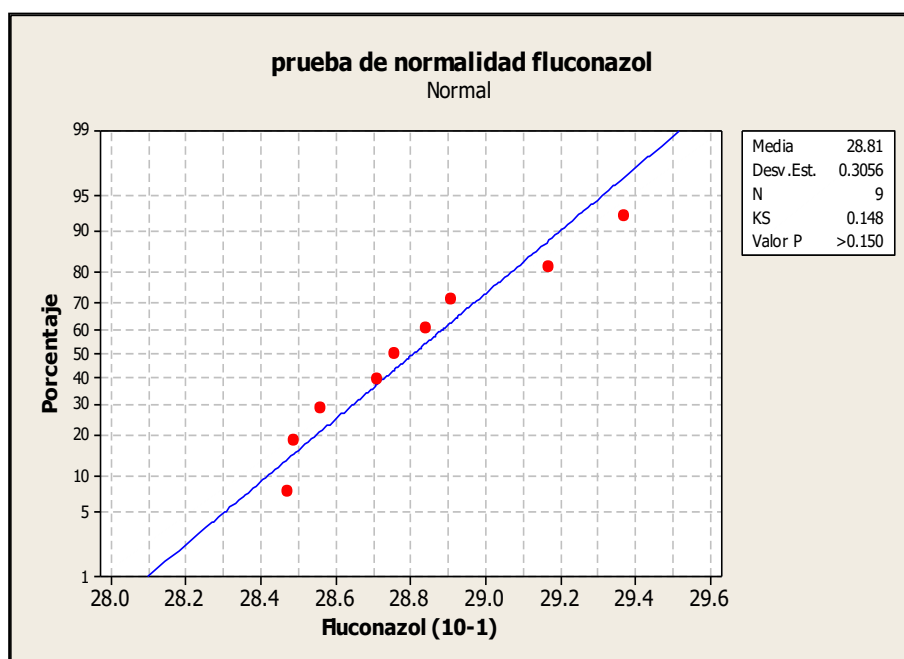


Figura 24. Resultado de prueba de Kolmogorov-Smirnov obtenido con minitab.

Sapogeninas:

Prueba de Anderson-Darling

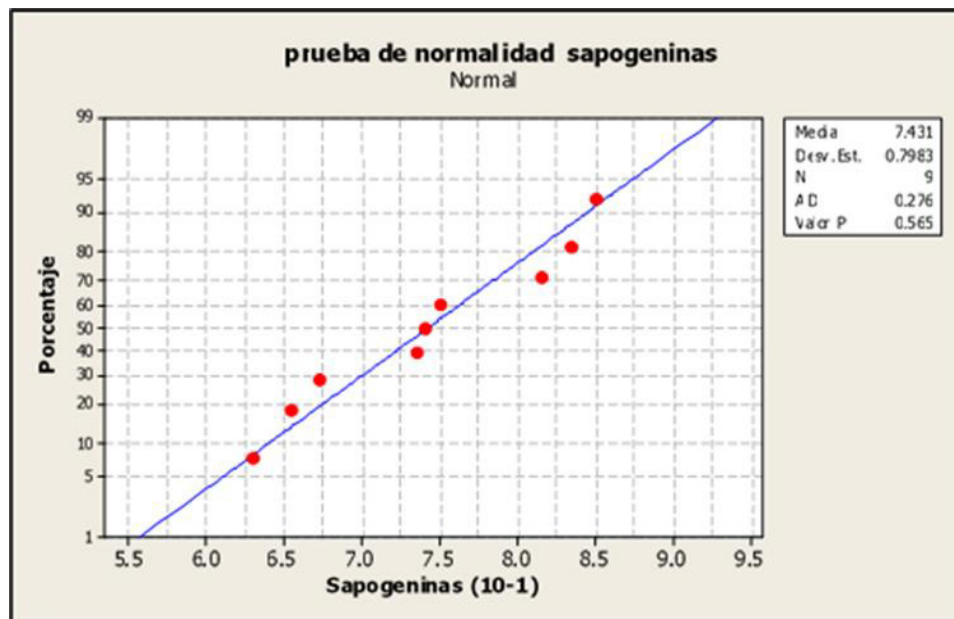


Figura 25. Resultado de prueba de Anderson-Darling obtenido con minitab.

Prueba de Ryan-Joiner

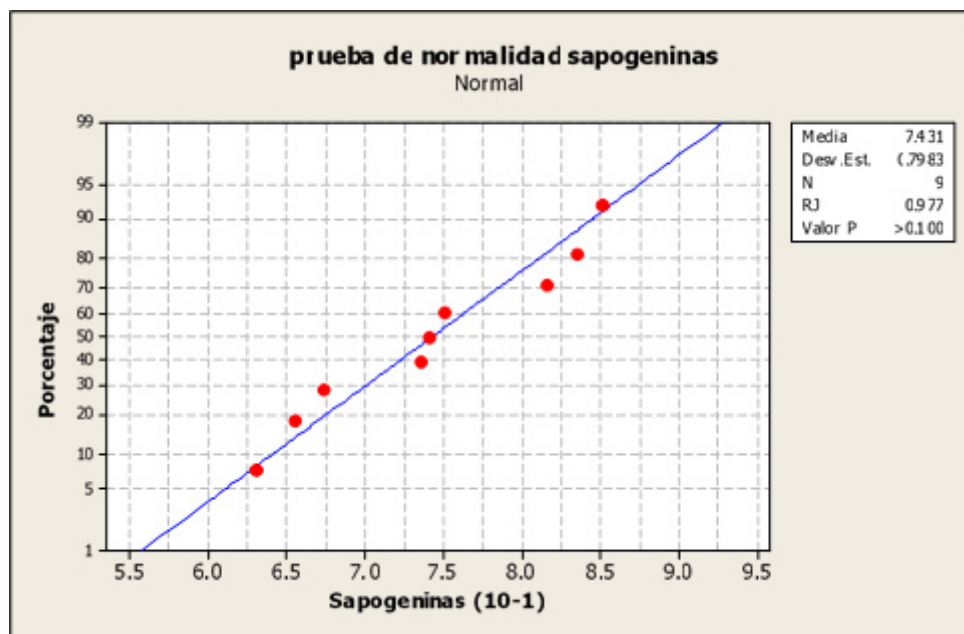


Figura 26. Resultado de prueba de Ryan-Joiner obtenidos con minitab.

Prueba Kolmogorov-Smirnov

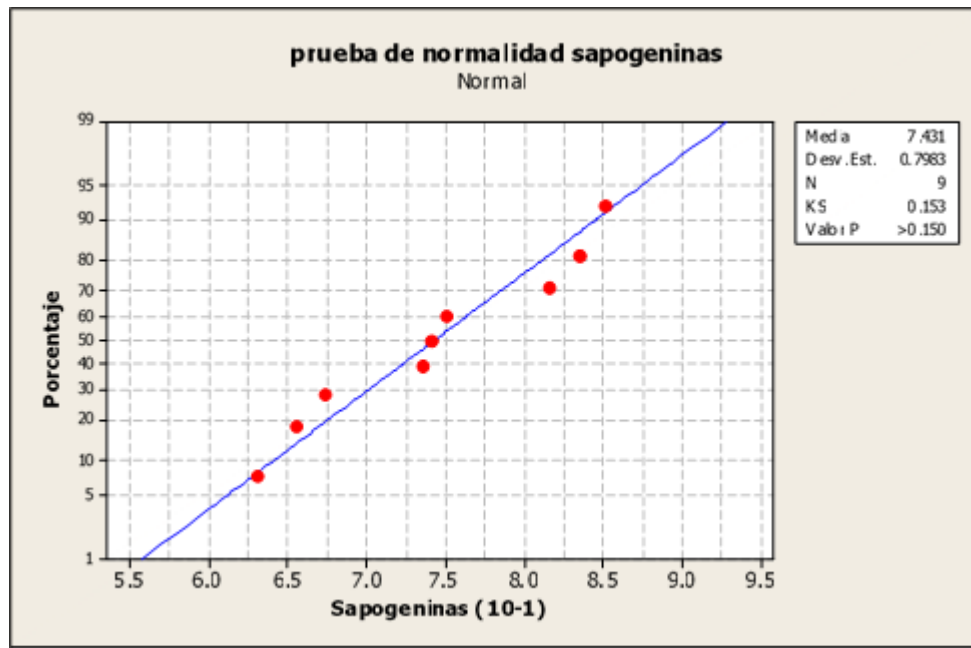


Figura 27. Resultado de prueba de Kolmogorov-Smirnov obtenido con minitab.

Resumen de resultados Fluconazol:

Tabla 6. Resumen de resultados de las pruebas de normalidad para Fluconazol

Fluconazol	AD	RJ	KS
p-valor	0.288	>0.100	>0.150
Decisión	No rechaza H_0	No rechaza H_0	No rechaza H_0
Conclusión	Distribución normal	Distribución normal	Distribución normal
	Los datos provienen de una población con distribución normal al 95% de confianza		

Si el p valor > alfa, no se rechaza la H_0

Resumen de resultados Sapogeninas:

Tabla 7. Resumen de resultados de las pruebas de normalidad para Sapogeninas purificadas

Sapogeninas	AD	RJ	KS
p-valor	0.276	>0.100	>0.150
Decisión	No rechaza H_0	No rechaza H_0	No rechaza H_0
Conclusión	Distribución normal	Distribución normal	Distribución normal
	Los datos provienen de una población con distribución normal al 95% de confianza		

Si el p valor > alfa, no se rechaza la H_0

b) Antes de proceder con la prueba t de student se debe verificar si estamos ante varianzas iguales o desiguales (homogeneidad de varianzas). Se utilizó la prueba F de Fischer mediante el programa excel:

i) Prueba de hipótesis

a). Fijar el NIVEL DE SIGNIFICANCIA (α) 0,05

b). HIPÓTESIS ESTADÍSTICA

H_0 : Varianza 1 \leq Varianza 2 Varianzas semejantes

H_1 : Varianza 1 > Varianza 2 Varianzas diferentes

(Varianza 1 > Varianza 2) numéricamente

Resultados prueba F para varianzas de dos muestras:

Tabla 8. Tabla de resultados obtenidos por Excel para la prueba F de Fischer

Estadísticos	Diámetros de sapogeninas concentración 0.1 mg/mL	Diámetros de fluconazol concentración 0.1 mg/mL
	(mm)	(mm)
Media	7.43	28.81
Varianza	0.64	0.09
Observaciones	9	9
Grados de libertad	8	8
F experimental	6.824	
P valor (una cola)	0.007	
F de tabla	3.438	

Decisión:

1. Si $F_{exp} < F_{crítico}$ No se rechaza la H_0
2. Si $F_{exp} > F_{crítico}$ Se rechaza la H_0

Conclusión:

1. Dado que el F_{exp} (6.82) es mayor que el $F_{crítico}$ (3.44) se rechaza la H_0 , por lo cual concluimos que las varianzas no son iguales entre el tratamiento con fluconazol con respecto al tratamiento con sapogeninas.
2. Dado que el p_{exp} (0.007) es menor que 0.05 se rechaza la H_0 , por lo cual concluimos que las varianzas no son iguales entre el tratamiento con fluconazol con respecto al tratamiento con sapogeninas.

c) Se procede a utilizar la prueba t de student para varianzas desiguales (test de Welch)

$$t_{exp} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

Hipótesis estadística:

Ho: $\mu_{Fluconazol} = \mu_{Sapogenina}$

H1: $\mu_{Fluconazol} \neq \mu_{Sapogenina}$

Tabla 9. Tabla de resultados obtenidos por Excel para la prueba t de student de comparación de medias

Estadísticos	Diámetros de fluconazol concentración 0.1 mg/mL (mm)	Diámetros de sapogeninas concentración 0.1 mg/mL (mm)
Media	28.81	7.43
Varianza	0.09	0.64
Observaciones	9	9
Grados de libertad	8	
Estadístico t	75.03	
P valor (una cola)	2.16×10^{-15}	
t crítico (una cola)	1.81	
P valor(dos colas)	4.32×10^{-15}	
t crítico (dos colas)	2.23	

Decisión:

- a. Si $t_{exp} < t_{crítico}$ No se rechaza la H_0
- b. Si $p > 0.05$ No se rechaza la H_0

Conclusión:

a. Dado que el t experimental (75.025) es mayor que el t crítico (2.23), se rechaza la H_0 . Por lo cual concluimos que la media del diámetro de halos de sapogeninas no es igual a la media de halos de fluconazol

b. Dado que el P valor (4.32007×10^{-15}) es menor que el 0.05, se rechaza la H_0 . Por lo cual concluimos que la media del diámetro de halos de sapogeninas no es igual que la media de halos de fluconazol.

7. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en los análisis químicos preliminares del extracto metanólico del pepino de mar indicaron reacciones positivas para esteroides característicos de las saponinas, en el caso de la reacción de Liebermann-Burchard (tabla 3) la coloración verdosa indicó la posible presencia de saponinas esteroides y la reacción de Salkowski (tabla 3) nos dio resultados igual de positivos al verse la formación del anillo coloreado, en cuanto a la identificación por cromatografía en capa fina se utilizó el reactivo de Liebermann-Burchard para el revelado de la placa obteniéndose bandas de color marrón-anaranjado, este color es indicativo para saponinas⁴⁰ mas no nos permite discriminar su naturaleza ya sea esteroidea o triterpénica (Figura 14). Soltani M. et al estudiaron las saponinas purificadas del pepino de mar *Holothuria leucospilota*, en el análisis de estos por cromatografía en capa fina utilizaron dos tipos de revelado, uno con el reactivo de Liebermann-Burchard y otro usando el reactivo de etanol: ácido sulfúrico; en el primero se exhibieron unas bandas azules-verdosas indicando la presencia de núcleos esteroides mientras que en el segundo identificaron una mancha que podría deberse a la presencia de esteroides, triterpenos o compuestos de ácidos biliares.⁴¹ Comparando la coloración obtenida por Liebermann-Burchard (Anexo F) en el tubo de ensayo resultó similar a la coloración de la placa cromatográfica de *H. leucospilota* mas no a la placa cromatográfica desarrollada por nuestro estudio (figura 14).

Kartikaningsih H et al realizaron un extracto etanólico del pepino de mar *Holothuria atra* al cual le aplicaron el ensayo de Liebermann-Burchard obteniendo una reacción positiva representada por el color marrón violáceo que caracteriza a los triterpenoides/esteroides.⁴² Según Carbajal L et al en su análisis preliminar de

esteroides y triterpenoides libres en las hojas, tallo y semillas de cupatá obtuvo coloraciones rojas, azules y verdes con el reactivo de Liebermann-Burchard indicando esto un resultado positivo para estos compuestos, este resultado es similar a la reacción preliminar con Liebermann-Burchard que se realizó al inicio del estudio (figura 14), si bien el origen de los compuestos analizados es diferente, es importante considerar esta analogía ya que los compuestos son de la misma naturaleza (esteroides o triterpenos).⁴³ Bahrami Y. et al en su estudio de distribución de saponinas en el pepino de mar *Holothuria lessona* realizó una cromatografía en capa fina visualizada en luz UV, utilizando además un rociado de 15% de ácido sulfúrico en solución de etanol y calentando por 10 minutos a 110°C, la placa desarrolló manchas marrones-morado oscuras características de grupos esteroideos-triterpenicos.⁴⁴

El análisis microbiológico de determinación de actividad antifúngica por difusión en placa sobre *Candida albicans* demostró estadísticamente que los halos de inhibición no eran iguales y claramente menores en las saponinas purificadas (tabla 5), es por ello que si bien se muestra actividad esta no es significativa; sin embargo es bien documentado que las saponinas de los pepinos de mar poseen buena actividad contra *Candida albicans*, Zhao Y. et al en su revisión de las actividades biológicas de los pepinos de mar menciona que las saponinas extraídas de *Bohadschia cousteau* mostraron una buena actividad antifúngica contra *Candida albicans*, además las saponinas solubles en agua de *Apostichopus japonicas* exhibieron una fuerte actividad inhibitoria contra *Candida albicans* y *Schizosaccharomyces pombe*.⁴⁵ Lawrence A. et al estudiaron la bioactividad de 11 especies de pepinos de mar del mar rojo egipcio, de estas 11 especies realizaron 14 juegos de extractos de las paredes corporales y probaron sus efectos sobre

diversas cepas de aislamiento clínico y de laboratorio, entre ellas *Candida albicans*. Utilizando placas de microtitulación de 96 pocillos demostraron que de las 11 especies estudiadas, tres especies (*A. mauritiana*, *P. graeffei* y *B. cousteau*) mostraron una buena actividad contra *Candida albicans* con concentraciones mínimas de inhibición en el rango de 75-100 µg/mL. De las tres especies que mostraron actividad, *A. mauritiana* fue el que presentó una actividad significativamente mayor, sobretodo la recolectada en el norte ($F = 207.1$, p valor < 0.001).⁴⁶

Sottorff I. et al estudiaron al pepino de mar chileno *Athyonidium chilensis* y evaluaron la acción de sus extractos purificados sobre los microorganismos *Aspergillus sp.*, *Botrytis sp.*, *Rhizopus sp.* y *C. albicans*; encontraron que la fracción 18 de los mencionados extractos mostró actividad contra *Aspergillus sp.*, *Botrytis sp.* y *Candida albicans*, con una zona de inhibición de 24,5 +/- 4 mm, 13,5 +/- 3 mm y 22 +/- 1 mm respectivamente. No hubo actividad contra *Rhizopus sp.*⁴⁷

Torres J. realizó una investigación de las propiedades antibacterianas y antifúngicas de los extractos del pepino de mar *Pearsonothuria graeffei* Semper, en ella evaluó 6 diferentes extractos (metanol pared del cuerpo, acetato de etilo cuerpo, hexano cuerpo, metanol túbulos cauverianos, acetato etilo tubulos cauverianos y hexano tubulos cauverianos) a 6 concentraciones diferentes contra un fármaco de referencia, en este caso Clotrimazol ya que la cepa *Candida albicans* ATCC 10231 resultó ser resistente a Fluconazol y Ketoconazol. Utilizó el método de difusión en disco de Kirby-Bauer y encontró que solo los extractos metanólicos y de hexano de la pared del cuerpo mostraron cierto grado de actividad inhibitoria contra *Candida albicans* ATCC 10231 en comparación con el fármaco antimicótico comercial de referencia Clotrimazol ($p < 0.05$).⁴⁸ Otro estudio sobre el pepino de mar

Pearsonothuria graeffei realizado por Khattaba R. et al comparó los efectos de sus extractos crudos y purificados sobre *Candida albicans* obteniendo como resultado que el extracto purificado poseía una mejor actividad que el extracto crudo dando un valor de concentración mínima inhibitoria de 10 µg/mL.⁴⁹

La propiedad antifúngica se atribuye a los triterpenoides y glicósidos esteroides (clase de saponina) presentes en los extractos probados. Una revisión sobre la química y biología de los pepinos de mar reporta la identificación de los glicósidos triterpenos como holotoxinas A y B que poseen distintas actividades inhibitorias del crecimiento contra microorganismos patógenos, como por ejemplo *Tricophyton sp*, *Candida sp* y *Trichomonas sp*.⁵⁰

El mecanismo por el cual las saponinas de los pepinos de mar actúan sobre la *Candida albicans* es explicado por Hing H. et al en su estudio de los extractos metanólicos de *Stichopus chloronotus* y *Holothuria edulis* sobre *Candida albicans*, en el estudio cortó y proceso la zona de inhibición para observarla en microscopios electrónicos de barrido y de transmisión (SEM Y TEM por sus siglas en inglés), encontró que la observación SEM del hongo tratado mostró formación de agujeros y una membrana celular distorsionada debido a la fuga celular en comparación con una célula normal de *Candida albicans*. Esta formación de orificios es causada por la saponina del extracto crudo, ya que su estructura es similar al colesterol de la membrana y reemplaza a este alterando la estabilidad de la membrana y provocando fugas. La observación TEM también reafirmó alguna forma de desorganización de *Candida albicans* y destrucción de sus orgánulos. Además haciendo una comparación concluyó que el extracto de *Stichopus chloronotus* posee una actividad antifúngica menor que *Holothuria edulis*.⁵¹

Es posible que la baja actividad de las sapogeninas de *Pattalus mollis* haya dependido de la parte del animal de donde fue extraído, Caulier G. et al en su revisión de la diversidad de saponinas de la familia Holothuriidae menciona que los glicósidos triterpénicos parecen estar particularmente concentrados en los túbulos cuverianos, un mecanismo de defensa especializado por algunas especies dentro de la familia Holothuriidae, aunque también se menciona que en algunas especies muchas saponinas son comunes tanto en la pared del cuerpo como en los túbulos cuverianos y a su vez puede que haya igual cantidad en ambos compartimentos. Habiendo dado esta explicación es posible que, si realizáramos extractos de los túbulos cuverianos de *Pattalus mollis*, obtengamos una mayor cantidad de extracto purificado y posiblemente más actividad; esto sería motivo para una nueva investigación.⁵²

Omran N y Allam N en su estudio de la actividad del pepino de mar *Holothuria polii* demostró con un nivel de significancia de $p < 0.05$ que las zonas de inhibición de los extractos A y B fueron de $20 \pm 0,4$ mm y $22 \pm 0,35$ mm respectivamente, siendo estos valores superiores a los presentados en el presente trabajo (ver tabla 5), esto puede deberse a que en el estudio se trabajó con extractos crudos obteniéndose así holoturinas (saponinas) siendo estas más efectivas que las geninas de nuestro estudio.⁵³

8. CONCLUSIONES

1. El análisis químico cualitativo realizado indicó la presencia de esteroides y glúcidos, componentes principales de las saponinas.
2. Se determinó que las sapogeninas extraídas del pepino de mar *Pattalus mollis* poseen una baja actividad antifúngica in vitro contra el microorganismo patógeno *Candida albicans* usando el método de difusión en placa.

9. RECOMENDACIONES

- Determinar la actividad de las saponinas obtenidas del extracto metanólico de pepino de mar por el método de Pocillos, ya que no se obtuvo un resultado óptimo con el método de difusión en disco (Anexo H).
- Continuar con el trabajo identificando las estructuras químicas de las sapogeninas obtenidas.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Minsa. Informe etes-daum-digemid/minsa. Lima: Minsa: 2014. [Citado 2019 Jun 12] Disponible en: <http://vikingcoastal.com/20405972-Informe-etes-daum-digemid-minsa.html>.
2. Cortés J, Pradab G. Protocolo de estudio y manejo de pacientes con candidiasis sistémica en adultos. Infectio. 2012; 16(3): 118-122.
3. Arikan S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. Medical Mycology. 2007; 45: 569-587.
4. Santafé G, Guzmán M, Torres O. Triterpenos Holostánicos con Actividad Antifúngica Obtenidos del Pepino de Mar *Holothuria floridana*, Recolectado en la Bahía de Cispatá, Córdoba-Colombia. Información Tecnológica. 2014; 25 (2): 87-92.
5. Sottorff I, et al. Characterization of bioactive molecules isolated from sea cucumber *Athyonidium chilensis*. Rev. biol. mar. oceanogr. 2013; 48 (1): 23-35.
6. Hing H, et al. Effect of Methanol Extracts from Sea Cucumbers *Holothuria edulis* and *Stichopus chloronotus* on *Candida albicans*. Microsc Microanal. 2007; 13 (2): 270-271.
7. Adibpour N, et al. Antibacterial and Antifungal Activity of *Holothuria leucospilota* Isolated From Persian Gulf and Oman Sea. Jundishapur J Microbiol. 2014; 7 (1): 87-88.
8. Ismail H, et al. Antifungal activity of aqueous and methanolic extracts from the Mediterranean sea cucumber, *Holothuria polii*. Journal de Mycologie Médicale. 2008; 18, 23-26.
9. Descriptores en Ciencias de la Salud: DeCS [Internet]. ed. 2017. Sao Paulo (SP): BIREME / OPS / OMS. 2017 [actualizado 2017 May 18; citado 2019 Jun 13]. Disponible en: <http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/decsserver/#bottom>.
10. Garza E. Caracterización taxonómica y molecular de *candida spp* en aislados clínicos de origen bucal en pacientes sanos y diabéticos de Nuevo León [Tesis de maestría en ciencias con acentuación en microbiología]. Nuevo León: Universidad Autónoma de Nuevo León Facultad de Ciencias Biológicas; 2012.
11. Brooks G, Carroll K, Butel J, et al. Microbiología Médica. 25a ed. México, DF: Mc. Graw Hill; 2011.

12. Laforet L. Estudio de pga 26, una proteína implicada en la arquitectura de la pared celular de *candida albicans* [Tesis doctoral en microbiología]. Valencia: Universitat de València Servei de Publicacions; 2010.
13. Villanueva J; Arenas R. Candidiasis mucocutánea. Una revisión. Revista Mexicana de Micología. 2007; 25: 91-104.
14. Pineda J, Cortés A, Uribarren T, et al. Candidosis vaginal. Revisión de la literatura y situación de México y otros países latinoamericanos. Rev. Méd. Risaralda. 2017; 23 (1): 38 – 44.
15. Cortés J, Pradab G. Protocolo de estudio y manejo de pacientes con candidiasis sistémica en adultos. Infectio. 2012; 16(3): 118-122.
16. J. Troisi, R. Di Fiore, C. Pulvento, et al. Saponinas. Capítulo Numero 3.3. En: Bazile D. et al. (Editores), “Estado del arte de la quinua en el mundo en 2013”: FAO (Santiago de Chile) y CIRAD, (Montpellier, Francia): pp. 317-330.
17. Ahumada A, Ortega A, Chito D, Benitez R. Saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.): un subproducto con alto potencial biológico. Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm. 2016; 45(3): 438-469.
18. Francis G, Kerem Z, Becker K. The biological action of saponins in animal systems: a review. British Journal of Nutrition. 2002; 88: 587–605.
19. Tránsito L. Saponósidos. Offarm. 2001; 20 (6):124-9.
20. Lock O. Investigación fitoquímica Métodos en el estudio de productos naturales. Lima: PUCP Fondo editorial; 2016.
21. Cheok C, Karim H, Sulaiman R. Extraction and quantification of saponins: A review. Food Research International. 2014; 59:16–40.
22. Lopez E. Estudio de aceites esenciales en la especie *Tagetes elliptica* Smith (chinche) [Tesis de grado en química]. Lima: Universidad Nacional de Ingeniería Facultad de Ciencias; 2010.
23. Ochoa L, Sarmiento J. Estudio fitoquímico de la especie vegetal *Bucquetia glutinosa* (L. f.) DC. (Melastomataceae) y evaluación de su actividad biológica [Tesis de grado]. Bogotá: Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales; 2018.
24. Viracacha L, Mora N. Extracción e identificación de lípidos. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. 2018.
25. Quesada S. Manual de experimentos de laboratorio para Bioquímica. San José: EUNED; 2007.

26. Ganju K, Ganju E. Pharma Triumph, An Encyclopaedia for gpat and all pharmacy recruitment and entrance exams. Bilaspur: Evincepub Publishing; 2018.
27. Slater M, Chen J. Sea Cucumber Biology and Ecology. Capitulo Numero 3 En: Brown N, Eddy S. (Editores), "Echinoderm Aquaculture," John Wiley & Sons: pp.47-55.
28. Prieto E. Taxonomía de Holothuroidea (Echinodermata) del mar del Perú [Tesis de grado en biología]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos Facultad de Ciencias Biológicas; 2010.
29. Arikan S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. Medical Mycology. 2007; 45: 569-587.
30. Balouiri M, Sadiki M, Koraichi S. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis. 2016; 6: 71-79.
31. Bland JM, Altman DG. Statistics Notes: Transforming data. BMJ 1996; 312: 770. [Medline]
32. Altman DG, Bland JM. Detecting skewness from summary information, BMJ 1996; 313:1200. [Medline]
33. Bland JM, Altman DG. Statistics Notes: The use of transformations when comparing two means. BMJ 1996; 312:1153. [Medline]
34. Moreno V, Vallescar R, Martín M. Las pruebas no paramétricas en el análisis estadístico de datos. Aten Primaria 1991; 8 (1): 58-60. [Medline]
35. Altman D. G. Preparing to analyse data. En: Practical statistics for medical research. London: Chapman and Hall; 1991. p.132-145.
36. Braitman LE. Confidence intervals asses both clinical significance and statistical significance [editorial]. Ann Intern Med 1991; 114 (6): 515-517. [Medline]
37. Berry G., Armitage P. Statistical Methods in Medical Research. 3 rd. ed. Oxford: Blackwell Science; 1994.
38. Farmacopea de los Estados Unidos de América 41-NF 36. Capítulo <62> (2018).
39. Soares BV, Morais SM, Fontenelle ROS, et al. Antifungal activity of plant extracts against *Microsporum canis* and *Candida spp.* strains. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat. 2015; 14 (4): 263 – 272.
40. Pascual ME, Carretero ME, Slowing KV, Villar A. Simplified Screening by TLC of Plant Drugs. Pharmaceutical Biology. 2002; 40 (2):139-143.
41. Soltani M, Parivar K, Baharara J, et al. Hemolytic and Cytotoxic Properties of Saponin Purified from *Holothuria leucospilota* Sea Cucumber. Reports of Biochemistry & Molecular Biology. 2014; 3 (1): 43-50

42. Kartikaningsih H, A'yunin Q, Soeprijanto A, et al. Black Sea Cucumber (*Holothuria atra*) Ethanol Extract as *Edwardsiella Tarda* Antibacterial. AIP Conference Proceedings. 2019 (1): 060010-1 – 060010-9.
43. Carvajal L, Hata Y, Sierra N, et al. Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de cupatá (*strychnos schultesiana* krukoff). Revista Colombia Forestal. 2009; 12:161-170.
44. Bahrami Y, Zhang W, Franco C. Distribution of Saponins in the Sea Cucumber *Holothuria lessona*; the Body Wall Versus the Viscera, and Their Biological Activities. Mar. Drugs. 2018; 16 (423): 1-30.
45. Zhao Y, Xue C, Zhang T, et al. Saponins from Sea Cucumber and Their Biological Activities. J. Agric. Food Chem. 2018; 66: 7222–7237.
46. Lawrence A, Afifi R, Ahmed M, et al. Bioactivity as an Options Value of Sea Cucumbers in the Egyptian Red Sea. Conservation Biology. 2009; 24 (1): 217–225.
47. Sottorff I, Aballay A, Hernández V, et al. Characterization of bioactive molecules isolated from sea cucumber *Athyonidium chilensis*. Revista de Biología Marina y Oceanografía. 2013; 48 (1): 23-35.
48. Torres J. Antibacterial and antifungal property of extracts derived from the body wall and cuvierian tubules of *Pearsonothuria graeffei* Semper (Black-spotted Sea cucumber). Frontiers Med. Chem. Drug Disc. 2017; 1(1): 2-9.
49. Rafat K, Mohamed E, Lawrence A, et al. Extraction, identification and biological activities of saponins in sea cucumber *Pearsonothuria graeffei*. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening. 2018; 21(3): 222-231.
50. Lakshmi V, Kumar S, Ali A, et al. Chemistry and biology of sea cucumbers. NPAIJ. 2014; 10(4): 102-112.
51. Hing H, Kaswandi M, Azraul-Mumtazah R, et al. Effect of Methanol Extracts from Sea Cucumbers *Holothuria edulis* and *Stichopus chloronotus* on *Candida albicans*. Microsc Microanal. 2007; 13(2): 270-271.
52. Caulier G, Van Dyck S, Gerbaux P, et al. Review of saponin diversity in sea cucumbers belonging to the family Holothuriidae. SPC Beche-de-mer Information Bulletin. 2011; 31: 48-54.
53. Omran N, Allam N. Screening of microbial contamination and antimicrobial activity of sea cucumber *Holothuria polii*. Toxicology and Industrial Health. 2012; 29(10): 944-954.

11. ANEXOS

ANEXO A: DATOS BIOMÉTRICOS DE LA ESPECIE ESTUDIADA

MUESTREO BIOMÉTRICO DE INVERTEBRADOS											
Zona de extracción (georeferencia):			Playa Redondo II (12°08'01.8"S 77°01'51.6"W)								
Método de extracción:			Buceo en la zona de búsqueda								
Captura total (Kg): 6.9 Kg											
Especie: <i>Potallus mollis</i>											
Responsable: Mc Rogers Jose Marthans Rojas											
Edson Bruno Garamendez Castillo											
Categoría I						Categoría II					
#	L. Total (mm)	Ancho (mm)	Peso total (g)	Peso eviscerado (g)	Sexo	#	L. Total (mm)	Ancho (mm)	Peso total (g)	Peso eviscerado (g)	Sexo
1	100	40	75	35	H	1	185	50	149	74	H
2	170	35	87	34	H	2	170	50	154	66	H
3	130	40	97	42	H	3	180	45	148	82	H
4	150	40	80	64	M	4	190	45	186	87	M
5	135	30	58	40	H	5	170	40	215	102	M
6	135	30	61	44	H	6	150	40	160	88	M
7	130	35	71	37	H	7					
8	160	35	80	46	M	8					
9	135	30	66	48	H	9					
10	170	35	129	69	H	10					
11	175	40	116	53	H	11					
12	130	30	94	51	H	12					
13	170	40	121	60	H	13					
14	160	40	137	70	H	14					
15						15					
16						16					
17						17					
18						18					
19						19					
20						20					
Promedio						Promedio					
Total				693		Total				499	
Categoría III						Categoría IV					
#	L. Total (mm)	Ancho (mm)	Peso total (g)	Peso eviscerado (g)	Sexo	#	L. Total (mm)	Ancho (mm)	Peso total (g)	Peso eviscerado (g)	Sexo
1	150	35	97	40	H	1	150	40	163	76	M
2	165	30	88	38	M	2	170	35	135	72	H
3	165	30	128	74	H	3	150	35	137	64	H
4	165	30	109	64	M	4	180	35	141	98	M
5	170	30	112	66	H	5	165	30	122	70	H
6	175	30	116	69	H	6	165	30	114	60	H
7	185	35	77	39	H	7	135	35	107	64	M
8	165	35	169	85	H	8	155	30	135	68	H
9	155	25	58	46	H	9					
10	170	40	125	57	H	10					
11	155	30	85	62	H	11					
12	185	30	103	71	H	12					
13						13					
14						14					
15						15					
16						16					
17						17					
18						18					
19						19					
20						20					
Promedio	167.0833333	31.66666667	105.5833333	59.25	-	Promedio	158.75	33.75	131.75	71.5	-
Total	-	-	1267	711	-	Total	-	-	1054	572	-

Categoría V						Categoría VI					
#	L. Total (mm)	Ancho (mm)	Peso total (g)	Peso eviscerado (g)	Sexo	#	L. Total (mm)	Ancho (mm)	Peso total (g)	Peso eviscerado (g)	Sexo
1	175	40	170	71	H	1	175	30	94	59	M
2	175	40	183	74	H	2	145	40	108	45	H
3	205	50	255	115	H	3	140	30	104	55	M
4	185	45	274	117	H	4	190	30	111	58	M
5	190	50	237	105	M	5	195	30	119	51	H
6	190	50	230	113	H	6					
7	230	40	238	124	H	7					
8	255	40	219	113	M	8					
9						9					
10						10					
11						11					
12						12					
13						13					
14						14					
15						15					
16						16					
17						17					
18						18					
19						19					
20						20					
Promedio	200.625	44.375	225.75	104	-	Promedio	169	32	107.2	53.6	-
Total	-	-	1806	832	-	Total	-	-	536	268	-
Peso total	3575	g									

ANEXO B: IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE ESTUDIADA

Ver pdf adjunto (Certificado de identificación de *Pattalus mollis*)



PERÚ

Ministerio
de la Producción



IMARPE
INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ

"Decenio de la Igualdad de oportunidades para mujeres y hombres"
"Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad"

OFICIO N° 727 -2019-IMARPE/DEC

Callao, 09 SET. 2019

Señor

MC.ROGGERS JOSÉ MARTHANS ROJAS

Mz. C Lote 1 Urbanización Covi

Rímac

Email: josemarthansrojas@gmail.com

Asunto: Confirmación taxonómica de especímenes identificados como pepino de mar (*Pattalus mollis*)

Referencias: Su Carta s/n de fecha 19.08.2019

Es grato dirigirme a usted, para saludarlo cordialmente y en atención al documento de la referencia, manifestarle que los ejemplares recibidos para su identificación taxonómica corresponden a la especie *Pattalus mollis* "Pepino de mar" o "Ancoco negro". Para tal efecto, se incluye en anexo la ficha técnica correspondiente.

Sin otro particular, es propicia la oportunidad para expresarle las seguridades de mi mayor consideración y estima.

Atentamente,

INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ

INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ

Hgo. Renato C. Carrasco
DIRECTOR EJECUTIVO Científico

EL PERÚ PRIMERO

ANEXO C: PESO DE EXTRACTO INICIAL OBTENIDO



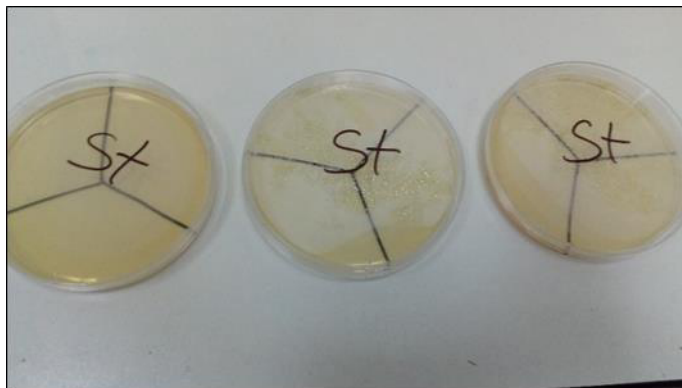
Anexo C. Peso obtenido del extracto inicial, obtenido a partir de la diferencia del peso del extracto+ frasco con el frasco vacío.

ANEXO D: PLACAS CON LAS 3 CONCENTRACIONES DE SAPOGENINAS



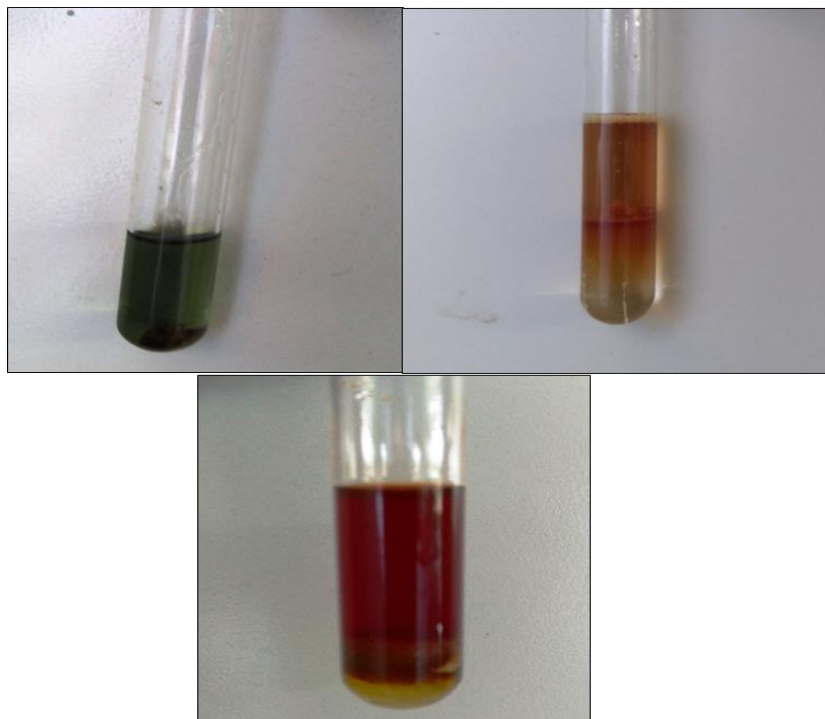
Anexo D. Placas con las 3 concentraciones de sapogeninas utilizadas (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} mg/mL)

ANEXO E: PLACAS CON ESTANDAR DE FLUCONAZOL



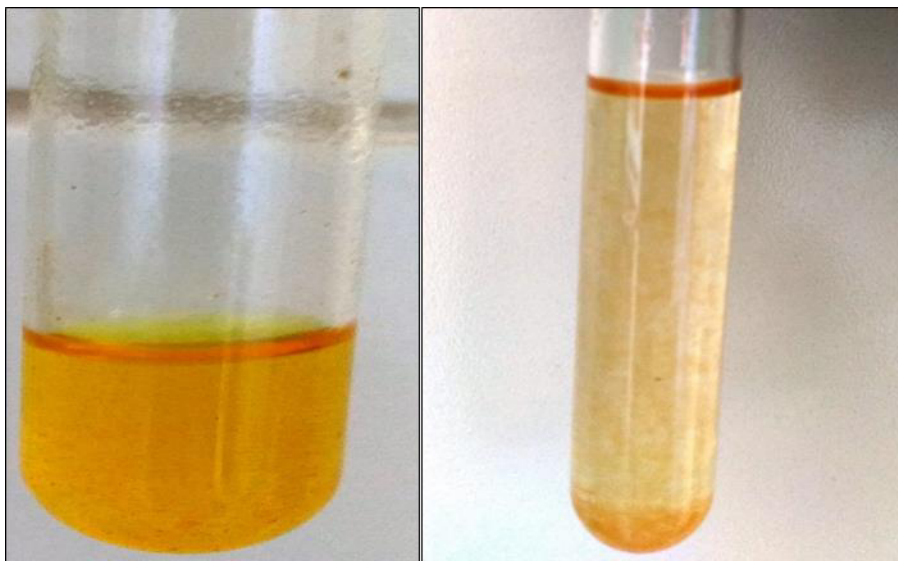
Anexo E. Placas con la concentración de estándar (10^{-1} mg/mL)

ANEXO F: Reacciones de identificación de saponinas (Liebermann-Burchard, Salkowski y Molish)



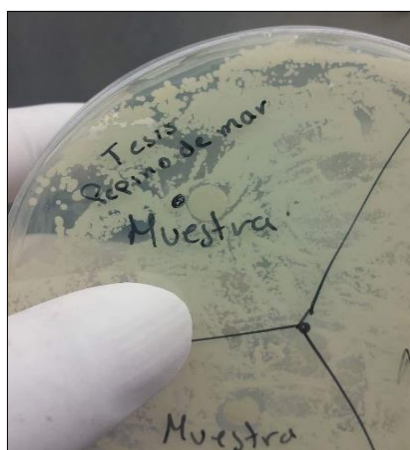
Anexo F. Tubos de ensayo con reacciones de Liebermann-Burchard, Salkowski y Molish en ese orden respectivo.

ANEXO G: Reacciones de identificación de lactonas sesquiterpénicas



Anexo G. Reacciones de identificación negativas para lactonas sesquiterpénicas

ANEXO H: Ensayos con la prueba de difusión en disco



→ Halo irregular

Anexo J. Halos de inhibición indefinidos (concentración 10^{-1}) usando el método de difusión en disco. Se observa irregularidad en lo halos.